



Universitat de Lleida

Alteraciones moleculares relacionadas con el carcinoma medular de tiroides: estudio mediante inmunohistoquímica y tissue-microarrays

María del Pilar Gallel Vicente

Dipòsit Legal: L.873-2015

<http://hdl.handle.net/10803/306437>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida
Departament de Ciències
Mèdiques Bàsiques



Institut de Recerca
Biomèdica de Lleida

ALTERACIONES MOLECULARES RELACIONADAS CON EL CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDES

ESTUDIO MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA Y TISSUE-MICROARRAYS

Tesis doctoral
M^a del Pilar Gallel Vicente
Lérida 2014

Directores:

Dr. Xavier Matías-Guiu Guía

Dr. Mario Encinas Martín.

A mi familia

Agradecimientos

A mis directores de tesis, los Dres Xavier Matias-Guiu y Mario Encinas Martín, sin los cuales no habría sido posible este proyecto; por su inspiración y ejemplo.

A Esmeralda Catelblanco, por su generosa colaboración y su amistad.

A Montse Martinez y a Joan Valls, por ayudarme a entender la estadística empleada y por sus amables consejos.

Al Servicio de Anatomía Patológica y en especial a Llum Barrera y a Maria Santacana, por su gran profesionalidad en el corte de los tejidos y en la inmunohistoquímica.

Al grupo de investigación de Ciencias Biomédicas del IRBLLeida, por el ambiente científico y de compañerismo que han creado y del que todos nos beneficiamos. Quiero destacar a Ana Macià, Ana Novell y Oscar Maiquez por su colaboración especial.



El Dr. Xavier Matías-Guiu Guia, Catedrático de Anatomía Patológica de la Universidad de Lleida, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida y Director del Instituto de Investigación Biomédica de Lleida (IRBLLEIDA)

Y

El Dr. Mario Encinas Martín, Profesor agregado de Biología celular de la Universidad de Lleida e investigador del IRBLLEIDA.

en calidad de co-directores,

CERTIFICAN:

que la tesis doctoral titulada " Alteraciones moleculares relacionadas con el carcinoma medular de tiroides. Estudio mediante inmunohistoquímica y tissue-arrays", realizada por M^a del Pilar Gallel Vicente reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, con la originalidad y calidad científica adecuada para poder ser presentada y defendida con el fin de optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firman el presente certificado.

Lleida, 18 de Diciembre de 2013

Vº Bº del co-director de la Tesis:

Dr. Xavier Matías-Guiu Guia

A blue ink signature of Dr. Xavier Matías-Guiu Guia, consisting of a stylized 'X' and 'G'.

VºBº de la co-director de la Tesis:

Dr. Mario Encinas Martín

A blue ink signature of Dr. Mario Encinas Martín, consisting of a stylized 'M' and 'E'.

ABREVIATURAS

ACTH: Hormona corticotropa.

APO1: Antígeno apoptosis 1.

ARTN: Artemina.

BCL-2: Familia de proteínas antiapoptóticas.

BCL-xL: B cell lymphoma extra large.

BCR-ABL: Quinasa de tirosina oncológica.

BH: Dominio de homología BCL-2.

CAKUT: Síndrome de anomalías congénitas del riñón y del tracto urinario.

CARD: Dominio de reclutamiento de caspasas.

Cbl: Linfoma línea B casitas.

CD95: Receptor de muerte.

CDC42: Cell Division Cycle 42.

CEA: Antígeno carcinoembrionario.

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

CMT: Carcinoma medular de tiroides.

CMTF: Carcinoma medular de tiroides familiar.

CR: Regiones conservadas.

COX-1/2: Citocromo c oxidasa isoforma 1 y 2.

COXIV2: Isoforma 2 de la subunidad IV citocromo c oxidasa.

CRD: Domino rico en cisteínas.

Crk: Proteínas de señales.

DED: Dominio efector de muerte.

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte.

DNA: Acido desoxirribonucleico.

DKK4: Proteína de la vía de señales Wnt.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

ERK: Proteínas quinasas reguladas de manera extracelular.

FADD: FAS- associating death domain protein.

FAS: Receptor de muerte.

FAS-L: Ligando FAS.

FLIP: Proteína inhibidora similar a FLICE.

FRS2: Proteína mediadora de señales.

GDNF: Factores neurotróficos derivados de la líneas celulares gliales

GDP: Guanina difosfato

GFLs: Ligandos de la familia de GDNF

GFR α 1: Receptor α 1 de los ligandos de la familia GDNF.

GPI: Glicofosfatidinositol.

Grb: Proteína unida al factor de crecimiento.

HCC: Hiperplasia de células C.

IAPS: Proteínas inhibidoras de la apoptosis.

IkB: Familia de proteínas inhibidoras de kB.

IKK: Quinasas inhibidoras de quinasas.

JNK: Quinasa Terminal c-Jun N.

KIT: Quinasa de tirosina oncológica.

KO: Knochckout.

LAR: Relacionado con el antígeno leucocitario común.

LOXL2: Lysil oxidase like protein 2.

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos.

MEN: Neoplasia endocrina múltiple.

MEN 2A: Neoplasia endocrina múltiple tipo 2^a.

MEN 2B: Neoplasia endocrina múltiple tipo 2B.

MEK: Miembro de la cascada de señales MAPK.

TMA: Tissue micro-arrays.

m TOR: Mamalian-target of rapamicin.

NF-κB: Factor nuclear kappa B.

Nck: Proteína de señales.

NNMT: N-metil transferasa

NRTN: Neurturina

PDGFR: Receptor para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

PDK1 Piruvato deshidrogenasa quinasa isoenzima 1.

PI3K: Quinasa de fosfatidilinositol-3.

PGL: Paraganglioma.

PGL/ PCCS: Síndromes de paraganglioma/feocromocitoma.

PLC-γ: Fosfolipasa C-γ.

PKA: Proteína quinasa A.

PKC: Proteína quinasa C.

PSPN: Peserfina.

PT: Paraganglioma tiroideo.

PTC: Carcinoma papilar de tiroides.

PTEN: Phosphatase and Tensin homoleg.

RAF: Familia de proteínas quinasas serina/treonina.

RAS: Familia de proteínas con acción GTPasa.

RET: "RE arranged during Transfection"(receptor tirosinquinasa).

RNA-m: Acido ribonucleico mensajero.

RPTP1J: Receptor de tipo proteína tirosina fosfatasa 1J.

RTK: Receptor tirosinquinasa.

SDH: Succinato dehidrogenasa.

Ser: Serina

SHC: Proteína transformante.

SHP1: Proteína tirosina osfatasa-1.

Spry: Familia de proteínas Sprouty

Src: Familia de proteínas tirosina quinasa.

SRD: Domino rico en serinas.

SSTR: Receptor de somatostatina.

STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción.

Thr: Treonina.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TNFR1: Receptor 1 del factor de necrosis tumoral.

TRAILR1: Receptor 1 del ligando que induce apoptosis relacionado con TNF.

TRADD: TNFRI-asociated death domain proteína.

TRAF2: Factor 2 asociado al receptor TNF.

TRAF 6: Factor 6 asociado a TNF.

TSH: Hormona estimulante del tiroides.

TTF-1: Factor de transcripción tiroideo 1.

UB: Yema uretérica.

Val: Valina.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

V EGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.

VIP: Péptido intestinal vasoactivo.

WD: Conducto nefrogénico o de Wolf.

WT: Wild-type.

1.- Resum

El carcinoma medul·lar de tiroide (CMT) és un tumor maligne de la glàndula tiroide, poc freqüent, que mostra diferenciació de cèl·lules C. El 25 % dels tumors esporàdics no mostren mutació de RET. Sprouty és antagonista de RET. El diagnòstic diferencial des del punt de vista microscòpic inclou diversos tumors, dels qual en destaca el paraganglioma tiroïdal (PT).

Les alteracions en diversos gens involucrats en CMT, juguen un paper important en la progressió tumoral i en el desenvolupament de lesions precursors. Els perfils d'expressió d'aquests gens poden millorar el coneixement del tumor i facilitar la obtenció de bateries immunohistoquímiques preceptives pel diagnòstic diferencial.

En aquesta tesi s'han realitzat tres estudis de la expressió d'alguns gens relacionats amb CMT mitjançant immunohistoquímica i tissue-arrays.

En el primer treball s'ha estudiat la expressió de membres de la família NF- κ B i la correlació amb tres possibles dianes: FLIP, BCLxL i ciclina D1. Les proteïnes NF- κ B estan activades freqüentment, en el CMT, sobretot les tumors que presenten mutació de RET. Les tres subunitats translocades amb més freqüència son p52, c-rel i p65, fet que mostra una activació per la via alternativa. Així mateix, s'ha detectat associació estadísticament significativa entre p65 i BCLxL.

En el segon estudi s'ha investigat el paper de Sprouty 1 (spry1) en el desenvolupament de la hiperplàsia de cèl·lules C en un grup de ratolins modificats genèticament, els quals es van comparar amb un grup de ratolins normals. Els animals amb delecció selectiva de spry 1, van mostrar un augment del nombre de les cèl·lules C, estadísticament significatiu en el grup dels ratolins adults joves.

Per últim, es proposa una bateria de tinció immunohistoquímica pel diagnòstic diferencial de CMT i els paragangliomes de cap i coll (PGL), partint dels seus perfils d'expressió, comprovant la seva fiabilitat en 4 exemples de PT. Posteriorment a la selecció de 7 proteïnes: CEA, CGRP/calcitonina, TTF-1 (marcadors de CMT), i NDUFA4L2, COXIV2 i VMAT2 (marcadors de PGL); s'han proposat quatre arbres de classificació i una regla classificadora final que combina CGRP amb els tres marcadors de PGL amb un 0% d'error. El diagnòstic correcte, sobretot en biòpsia o citologia, permetrà escollir el tractament adequat.

2.- Resumen

El carcinoma medular de tiroides (CMT) es un tumor maligno de la glándula tiroides, poco frecuente, que muestra diferenciación de células C. El 25% de los tumores esporádicos no muestran mutación de RET. Sprouty es antagonista de RET. El diagnóstico diferencial desde el punto de vista microscópico incluye varios tumores, entre los que destaca, el paraganglioma tiroideo (PT).

Las alteraciones en diversos genes involucrados en CMT, juegan un papel importante en la progresión tumoral y en el desarrollo de lesiones precursoras. Los perfiles de expresión de esos genes pueden mejorar el conocimiento de este tumor y facilitar la obtención de baterías inmunohistoquímicas preceptivas para el diagnóstico diferencial.

En esta tesis se han realizado tres estudios de la expresión de algunos genes relacionados con CMT mediante inmunohistoquímica y tissue-arrays.

En el primer trabajo se ha estudiado la expresión de miembros de la familia NF- κ B y la correlación con tres posibles dianas, FLIP, BCLxL y ciclina D1. Las proteínas NF- κ B están activas con mucha frecuencia, en el CMT, sobre todo los tumores que muestran mutación de RET. Las tres subunidades translocadas con más frecuencia son p52, c-rel y p65, lo que parece indicar una activación por la vía alternativa. Asimismo se ha detectado asociación estadísticamente significativa entre P65 y Bcl-xL.

En el segundo estudio se investigó el papel de Sprouty 1 (spry1) en el desarrollo de la hiperplasia de células C .en un grupo de ratones modificados genéticamente y se comparó con un grupo de ratones normales. Los animales con delección selectiva de spry1 mostraron un aumento del número de las células C, estadísticamente significativo en el grupo de ratones adultos jóvenes.

Por último, se propone una batería de tinción inmunohistoquímica para el diagnóstico diferencial del CMT y los paragangliomas de cabeza y cuello (PGL), partiendo de sus perfiles de expresión, comprobando su fiabilidad en 4 ejemplos de PT con un error predictivo del 0%. Tras la selección de 7 proteínas: CEA, CGRP/calcitonina, TTF-1 (como marcadores de CMT) y NDUFA4L2, COXIV2 y VMAT2 (como marcadores de PGL), se ha propuesto una regla de clasificación que combina CGRP o calcitonina con los tres marcadores de PGL con 0% de error predictivo. El diagnóstico correcto, sobretodo en biopsia o citología, permitirá elegir el tratamiento más adecuado para el tumor en estudio.

3.- Abstract

Medullary thyroid carcinoma (MTC) is a rare and malignant type of tumour which affects the thyroid gland and exhibits C-cell differentiation. 25% of its sporadic tumours do not show signs of RET mutation. Sprouty is a RET repressor. From the microscopic point of view, its differential diagnosis reveals various tumours, amongst which it is relevant to highlight Thyroid Paraganglioma (TP).

Some of the genetic alterations associated with MTC play a very important role in tumour progression and the development of initial lesions. Expressing the profiles of these genes could help to improve our knowledge of this tumour and also help us to discover immunohistochemical batteries which would help in the differential diagnosis between TP and MTC.

This doctoral thesis includes three studies of the expression of some of the genes that have been related to MTC through immunohistochemical staining and tissue-arrays.

The first work studied the expression of members of the NF- κ B family and its correlation with three putative targets: FLIP, BCLxL and Cyclin D1. NF- κ B proteins are often active in MTC and this is particularly true of those which exhibit RET mutations. The fact that the three most frequently translocated subunits were p52, c-rel and p65 would appear to point to alternative pathway. A statistically significant association was also detected between p65 and Bcl-xL.

The second study investigated the role of Sprouty 1 (*spry1*) in the development of C-cell hyperplasia in a group of genetically modified which were compared with a group of normal mice. The mice with a selective deletion of *spry1* exhibited an increase in the number of C cells; this was statistically significant in the group of young adult mice.

In the final study, we proposed the use of an immunohistochemical staining battery in order to carry out a differential diagnosis between MTC and neck and head paragangliomas (PGL), based on their expression profiles and checking their reliability in 4 examples of PT. After selecting 7 proteins: CEA, CGRP/calcitonin and TTF-1 (which are markers for MTC) and NDUFA4L2, COXIV2 and VMAT2 (which are markers for PGL), we proposed a final rule for classification which combines CGRP/calcitonin with the 3 PGL markers, with a prediction error of 0%. The correct diagnosis, particularly in the biopsy or cytology, would make it possible to choose the most appropriate treatment.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDES	2
1.1.1 Epidemiología	2
1.1.2 Etiología	3
1.1.3 Clínica	3
1.1.4 Aspecto macroscópico	5
1.1.5 Aspecto microscópico	6
1.1.5.1 Inmunohistoquímica.....	8
1.1.5.2 Microscopía electrónica	9
1.1.5.3 Diagnóstico diferencial.....	9
1.1.2 Lesiones precursoras	9
1.1.3 Histogénesis.....	12
1.1.4 Alteraciones genéticas.	12
1.1.5 Tratamiento	14
1.1.5.1 Tratamiento del CMT irresecable o metastásico.....	15
1.1.6 Pronóstico	16
1.2 RET	16
1.2.1 El receptor RET	17
1.2.2 Estructura	17
1.2.3 Mecanismos de activación de RET	18
1.2.4 Regulación de la actividad de RET	19
1.2.5 Consecuencias moleculares de la activación de RET	20
1.2.6 Vías de transducción de señales mediadas por RET	22
1.2.6.1 Vía RAS/RAF/ERK	22
1.2.6.2 Vía PI3K/Akt	23

1.2.7 RET en cáncer de tiroides.....	24
1.2.8 RET en el carcinoma medular de tiroides	25
1.3. FACTOR NUCLEAR KAPPAB.....	28
1.3.1 Estructura y función.....	28
1.3.2 Relación de NF-kB y cáncer.....	32
1.3.3 NF-kB y cancer de tiroides	33
1.4 APOPTOSIS	34
1.4.1 Generalidades.....	34
1.4.2 Familia de las caspasas	35
1.4.3 Vía extrínseca de la apoptosis	36
1.4.5 Vía intrínseca de la apoptosis	37
1.4.6 Relación de NF-kB con la regulación de la apoptosis	38
1.5 SPROUTY.....	41
1.5.1 Familia de proteínas sprouty	41
1.5.2 Mecanismos de acción de Sprouty.....	42
1.5.3 Sprouty y cáncer	47
1.5.4 Sprouty y cáncer de tiroides.....	48
1.6 PARAGANGLIOMAS TIROIDEOS.....	49
1.6.1 Aspectos generales.....	49
1.6.2 Clínica	51
1.6.3 Aspecto macroscópico	51
1.6.4 Características microscópicas.....	51
1.6.5 Inmunohistoquímica	53
1.6.6 Alteraciones moleculares	54
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55

3. MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.1 MATERIAL	61
3.1.1 Tumores	61
3.1.1.1 Carcinomas medulares de tiroides	61
3.1.1.2 Paragangliomas	62
3.1.2 Animales	62
3.2 MÉTODOS	63
3.2.1 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE LOS TMA	63
3.2.1.1 Selección de los casos	63
3.2.1.2 Procedimiento para la construcción de los TMA	65
3.2.1.2.1 Preparación del bloque receptor.	65
3.2.1.2.2 Diseño de los TMA	65
3.2.1.2.3 Construcción de los TMA	66
3.2.1.2.4 Corte de los TMA	67
3.2.1.2 Preparación histológica del resto del material.	68
3.2.2 PROCESAMIENTO DEL MATERIAL DEL ESTUDIO DE LAS CELULAS C.	68
3.2.3 INMUNOHISTOQUÍMICA	69
3.2.3.1 Estudio de la familia de proteínas NF-kB y sus genes diana en CMT	69
3.2.3.2 Evaluación de las células C en dos grupos de ratones.	71
3.2.3.3 Estudio inmunohistoquímico comparativo de 6 proteínas entre los PGL y CMT	72
3.3.4 METODOS ESTADISTICOS	74
3.3.4.1 Programa estadístico y significación	75

4. RESULTADOS	77
4.1 RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS NF- κ B Y SUS GENES DIANA EN EL CMT	79
4.2 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LAS CÉLULAS C EN DOS GRUPOS DE RATONES, UNO DE ELLOS, MODIFICADO GENÉTICAMENTE PARA SPRY1 (DELECCIÓN COMPLETA)	87
4.2.1 Estudio piloto.....	87
4.2.2 Estudio completo: fases 1 y 2	88
4.3 RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO COMPARATIVO ENTRE PGL DE CABEZA Y CUELLO, Y CMT.....	93
4.3.1 Análisis diferencial y validación del TMA.....	93
4.3.2 Árboles de clasificación y regla de clasificación global	96
4.3.3 Evaluación de los 4 casos de PT	99
5. DISCUSIÓN	103
6. CONCLUSIONES.....	114
7.BIBLIOGRAFIA	118
8. ANEXO.....	137

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDES

El carcinoma medular de tiroides (CMT) es un tumor maligno de la glándula tiroides que muestra diferenciación de células C. En 1959, Hazard y col. Describieron las características clínicas, anatomopatológicas y evolutivas del CMT, separándolo del resto de los carcinomas tiroideos.

El CMT tiene su origen en el crecimiento neoplásico de las células parafoliculares del tiroides o células C. Estas células derivan de la cresta neural, de las 4ª y 5ª bolsas faríngeas, migran hacia la línea media cervical donde se unen a los lóbulos tiroideos y forman parte del folículo tiroideo. No guardan un patrón de distribución homogénea, ya que la mayor concentración se encuentra en el tercio medio del lóbulo (Hazard, 1977).

Las células parafoliculares sintetizan calcitonina, hormona identificada en el 1962 por Copp y colaboradores, que disminuye el calcio en la sangre. Las células parafoliculares fueron denominadas como células C, a partir de ese momento. Estas células (normales o neoplásicas) además de calcitonina, pueden expresar otras proteínas como son: la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), somatostatina, proopiomelanocortina, beta-endorfina, beta-lipotropina, hormona melanoestimulante, sustancia P, neurotensina, factor de crecimiento neural, péptido liberador de gastrina, prostaglandinas E1 y F2, serotonina, melanina, histaminasa, enolasa neuroespecífica, antígeno carcinoma embrionario (CEA), katecalcina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), cromogranina A y otras sustancias peptídicas

1.1.1 Epidemiología

El CMT es un carcinoma neuroendocrino muy poco frecuente cuyo rango oscila del 5-10% de los tumores tiroideos (Matias-Guiu et al., 2004). La mayoría de los casos, alrededor del 75%, son esporádicos y se presentan con una frecuencia similar en todo el mundo. La media de edad es de 50 años con un ligero predominio en mujeres. El resto (25%) son hereditarios, causados por una mutación germinal en el proto-oncogen RET, que conlleva aumento de

función de la proteína (Komminoth et al., 1995). Se transmite con un patrón hereditario autosómico dominante como Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 (MEN2) de tres formas clínicas: MEN2A, MEN2B o Carcinoma Medular de Tiroides Familiar (CMTF) (Elisei et al., 2007; Zbuk and Eng, 2007).

La forma más común del CMT hereditario es el MEN2A (55%), que fue descrito por Sipple en 1961. La penetrancia es de casi el 70%, a los 70 años. La mayoría de los pacientes desarrollan el tumor en la adolescencia tardía o en los primeros años de la vida adulta (Dralle et al., 1998; Wells et al., 1994). El síndrome MEN2B comprende el 5-10% de los síndromes MEN2. Los tumores se presentan generalmente en la infancia. Recientes estudios indican que podrían diagnosticarse entre 1 y 31 años (Brauckhoff et al., 2004). El 35-40% de los casos hereditarios corresponden al CMTF. Se manifiesta hacia los 50 años, con algunos casos descritos entre los 20 y los 40 (Farndon et al., 1986; Lodish and Stratakis, 2008).

1.1.2 Etiología

La etiología de los casos esporádicos es desconocida. En raras ocasiones estos tumores pueden originarse en el contexto de la Enfermedad de Hashimoto, pero esta asociación es probablemente coincidente. Escasos datos sugieren que la hipercalcemia crónica puede asociarse a un incremento de la incidencia de estos tumores (Livolsi and Feind, 1979) .

1.1.3 Clínica

La mayoría de los pacientes con CMT esporádico presentan un nódulo tiroideo doloroso y “frío” en la gammagrafía. Más del 50% de los casos, tienen metástasis ganglionares, que aparecen de forma temprana, principalmente en los ganglios linfáticos laterales y paratraqueales. En alrededor del 15% de los casos puede haber metástasis a distancia. Los órganos más afectados son el hígado, los pulmones, los huesos y, con menor frecuencia, el cerebro y la piel (Pacini et al., 2010).

El crecimiento local extenso puede asociarse a disfagia y obstrucción de la vía aérea. Casi todos los carcinomas medulares de tiroides producen calcitonina y elevación de los niveles séricos de la hormona. Un gran volumen tumoral y la presencia de metástasis, se asocian a diarrea y rubor, debido en parte, a los altos niveles de calcitonina.

Las células tumorales pueden producir un gran número de péptidos y aminas, previamente mencionados. La liberación de estas sustancias puede ocasionar un síndrome paraneoplásico. Hay casos documentados de Síndrome de Cushing asociado a CMT, debido a la producción paraneoplásica de ACTH (Hijazi et al., 1992; Smallridge et al., 2003)

Pueden verse casos de microcarcinomas (<1cm), la mayoría como hallazgos incidentales, que se han descubierto en pacientes con hipercalcemia o en casos de Hiperplasia Nodular (Guyétant et al., 1999). Constituyen el 15,7% de todos los carcinomas incidentales encontrados asociados a esas dos patologías y el 0,57% de todos los nódulos. (Matias-Guiu et al, 2004).

Los pacientes con síndrome MEN2A presentan CMT , en más del 90% de los casos , como primera manifestación de la enfermedad, asociado a Feocromocitoma en el 50% de los casos y a hiperparatiroidismo primario en el 10-35% (Yip et al., 2003). Se han identificado dos variantes de MEN2A en una minoría de pacientes, una de ellas asociada a Liquen Cutáneo Amiloidótico y la otra con una forma limitada de la Enfermedad de Hirschprung (Kouvaraki et al., 2005).

Los pacientes con síndrome MEN2 de tipo B presentan CMT (>90%), Feocromocitoma (50%) y, otros tumores, como ganglioneuromas, en cualquier punto del tracto gastrointestinal (Ramos-Levi et al., 2012), o neuromas en la lengua, labios y conjuntiva. El aspecto externo de los pacientes es peculiar y se conoce como hábito corporal marfanoide (los 2 últimos datos son especialmente útiles como signos de sospecha clínica para el diagnóstico temprano). Se han descrito trastornos de la conducción nerviosa y algunos

casos de neuropatía esclerótica o fibras nerviosas corneales meduladas (Kane et al., 1995).

Se considera CMTF cuando se observa el tumor tiroideo, en 2 o más individuos de una misma rama familiar, sin feocromocitoma ni hiperparatiroidismo. Algunos de los casos, considerados como CMTF, pueden presentar solamente hiperplasia de las células C (HCC) sin formación de tumor (Matias-Guiu et al, 2004).

Enfermedad	Clínica
MEN2A	CMT, feocromocitoma, hiperplasia o Adenoma de paratiroides
MEN2A con liquen amiloidotico cutaneo	MEN2A + lesion pruriginosa cutanea en la espalda
MEN2A o CMTF con E. de Hirschsprung	MEN2A o CMTF con agangliosis intestinal
MEN2B	CMT. Feocromocitoma, ganglio-neuromatosis intestinal y mucosa ,anomalias oculares y hábito marfanoide
CMTF	CMT

Tabla I .Variantes clínicas de los síndromes MEN 2.

1.1.4 Aspecto macroscópico

El CMT se localiza en el tercio medio del lóbulo, en la zona donde predominan las células C. Los tumores son firmes, de color beige o blanco-grisáceo, de consistencia finamente granular y están bien delimitados, pero no encapsulados. El tamaño varía desde menos de 1cm a varios centímetros. Los tumores esporádicos suelen ser únicos y los familiares son múltiples y bilaterales (Matias-Guiu et al., 2004)

1.1.5 Aspecto microscópico

La morfología microscópica del CMT es bastante variable. Los patrones característicos son la presencia de nidos, cordones o trabéculas de células poligonales, redondas o fusiformes separadas por varias cantidades de estroma fibrovascular, formando una imagen más o menos lobular o trabecular. Los nidos epiteliales varían de tamaño y forma. Suele crecer de forma no cohesiva (Papotti et al., 1996; Uribe et al., 1985).

Las células tumorales muestran el núcleo oval o redondo de cromatina dispersa y nucleolo regular y pequeño (excepto en la variante oncocítica). En general las figuras de mitosis son escasas. En raras ocasiones hay tumores de núcleo pleomórfico e hipercromático, sin embargo este tumor no tiene el pronóstico ominoso de los carcinomas indiferenciados. El citoplasma es granular, de márgenes mal definidos y de color variable, de eosinófilo a anfófilo. A veces las células tumorales muestran un aspecto diferente; observándose tumores con células de morfología plasmocitoide, fusiforme, escamosa (Dominguez-Malagon et al., 1989), oncocítica (Harach and Bergholm, 1988), de células claras (Landon and Ordonez, 1985) y de células pequeñas (Eusebi et al., 1990). Se han descrito escasos casos que pueden contener melanina (Singh et al., 2008). En más del 40% de los carcinomas se ha descrito producción de mucina (Zaatari et al., 1983).

La mayoría de tumores muestran patrones y citología mixta. Además de los patrones ya mencionados, se han descrito variantes menos comunes como la papilar (Sambade et al., 1988) o pseudopapilar, y las de tipo carcinoide (Harach and Bergholm, 1993), paragangliomatosa (Ikeda et al., 1998), neuroblastomatosa (Harach and Bergholm, 1992) y angiosarcomatosa (Papotti et al., 2008).

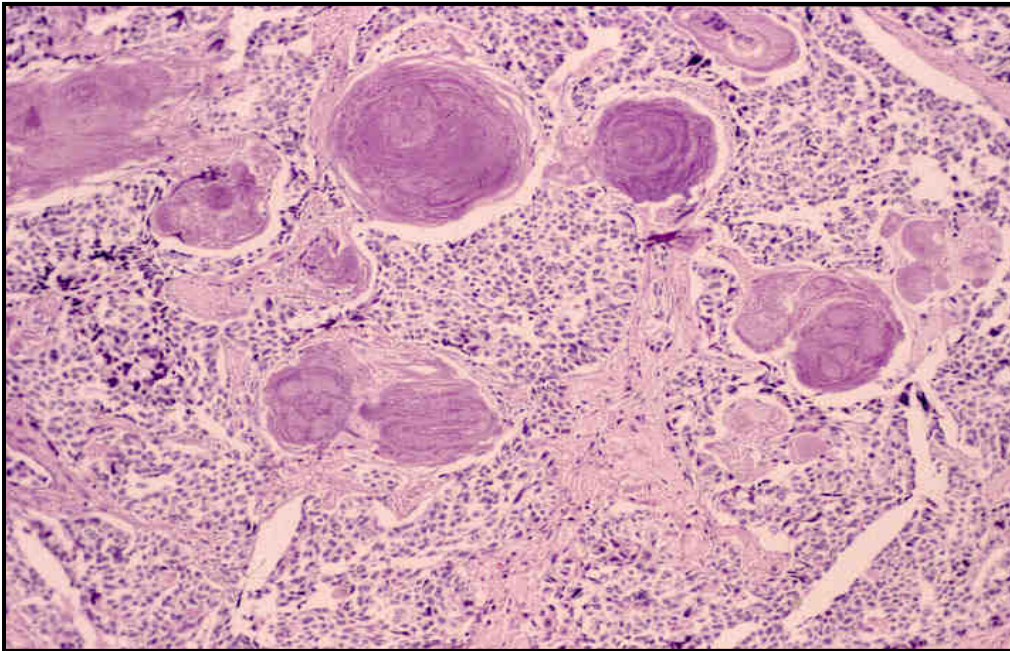


Fig. 1: Imagen microscópica de un CMT.Nidos tumorales irregulares separados por tractos, estromales hialinizados y calcificados. Células tumorales con marcada deshiscencia.

Las áreas de necrosis y hemorragia son poco frecuentes y están limitadas a los tumores grandes. Pueden verse pequeñas concreciones de tipo cuerpos de psammoma. La invasión linfática es frecuente. Ocasionalmente pueden identificarse células subtentaculares, positivas para la tinción de proteína S-100, en la periferia de los nidos tumorales; este hallazgo es más común en los carcinomas hereditarios (Matias-Guiu et al., 1998).

Las células neoplásicas, casi siempre, infiltran el tejido tiroideo circundante y atrapan folículos tiroideos. El estroma tumoral también muestra un aspecto variable. En algunos casos está muy vascularizado y en otros contiene abundante colágeno hialinizado que puede mostrar calcificación. En el 80% de casos pueden verse depósitos estromales de amiloide, rojo congo positivos. Algunas veces provocan reacción de células gigantes de tipo a cuerpo extraño (Matias-Guiu et al., 2004).

1.1.5.1 Inmunohistoquímica

El CMT es generalmente positivo en las tinciones argirofílicas. Las células tumorales son inmunoreactivas para calcitonina, en la gran mayoría de casos (95% difusa y extensa, el resto focal), y en los casos restantes se detecta RNA-m de calcitonina mediante técnicas de hibridación "in situ". La mayoría de casos expresan antígeno carcinoembrionario (CEA) (Lloyd et al., 1983; DeLellis, 1995) también son positivas para algunos marcadores neuroendocrinos como cromogranina A y synaptofisina. Asimismo son positivas para TTF-1 y citoqueratinas de bajo peso molecular.

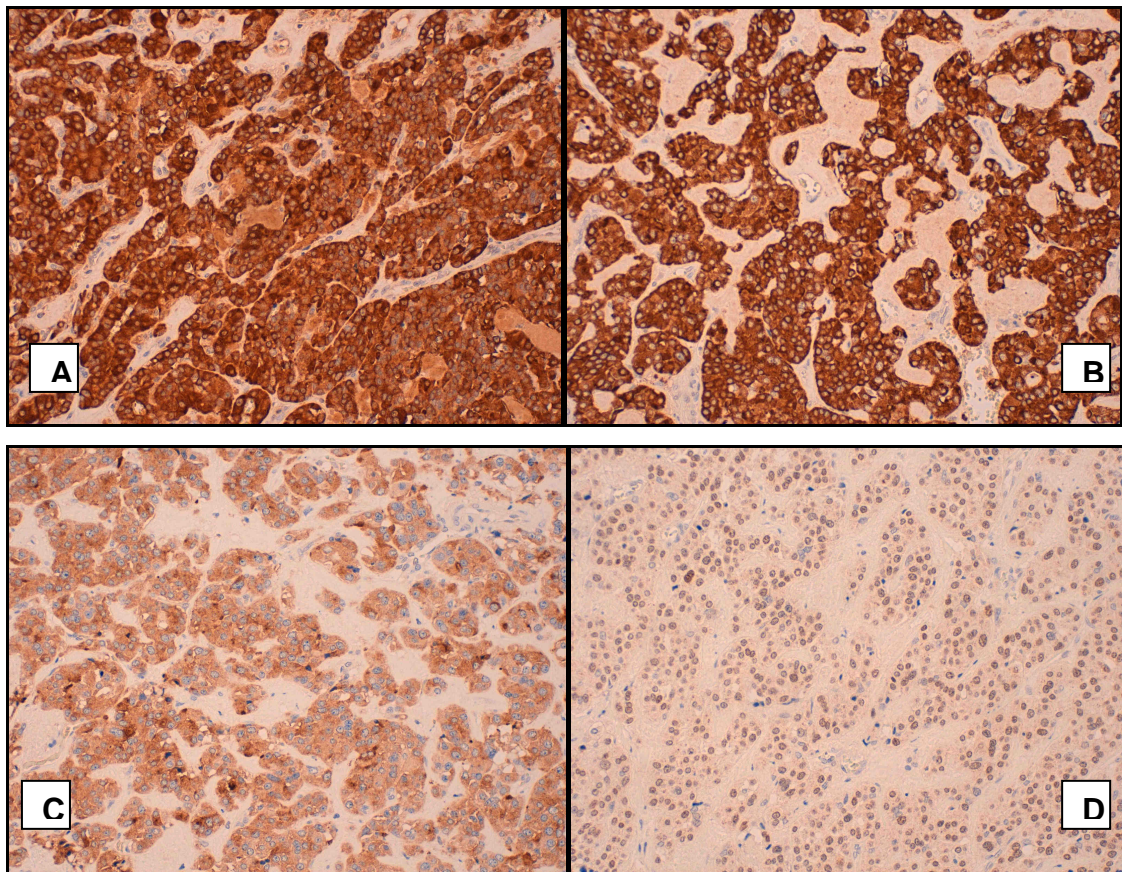


Fig. 2: Imágenes de las tinciones inmunohistoquímicas más características del CMT en varios casos de la serie estudiada: calcitonina (A), cromogranina (B), sinaptofisina (C) y TTF1 (D) a 200x.

1.1.5.2 Microscopía electrónica

El estudio ultraestructural muestra que las células tumorales contienen 2 tipos principales de gránulos secretorios: gránulos de tipo 1 de 280nm y gránulos de tipo 2 rodeados de una membrana más electrón-densa con un diámetro medio de 130nm, en los que almacenan calcitonina y los otros péptidos producidos (Sobrinho-Simoes et al., 1990).

1.1.5.3 Diagnóstico diferencial

El diagnóstico de carcinoma medular debe considerarse ante cualquier tumor tiroideo que muestre un aspecto inusual. Desde del punto de vista microscópico, incluye: paraganglioma tiroideo (PT), adenoma trabecular hialinizante, carcinoma folicular de patrón trabecular, carcinomas pobremente diferenciados de patrón sólido, trabecular o insular; tumores oncocíticos, tumores paratiroides intratiroides y las raras metástasis de carcinomas neuroendocrinos de otros órganos. Por otro lado, las metástasis ganglionares de carcinoma medular sin primario conocido, pueden confundirse con melanoma metastático o carcinoma neuroendocrino metastático.

Las características que ayudan más en el diagnóstico son el aspecto citomorfológico del tumor, la presencia de finos septos fibrovasculares y la positividad inmunohistoquímica para calcitonina, CEA y citoqueratinas de bajo peso molecular (Matias-Guiu et al ,2004).

1.1.2 Lesiones precursoras

La HCC es el precursor del carcinoma medular invasor en los síndromes tumorales hereditarios (Wolfe et al., 1973). El criterio clásico de HHC es la presencia de más de 50 células por campo de bajo aumento, en las áreas de más alta concentración, en ambos lóbulos tiroideos (Albores-Saavedra and Krueger, 2001)

Sin embargo el término HCC se refiere a 2 tipos de lesión con potencial neoplásico diferente, conocidas como HCC “neoplásica” y HCC “reactiva”. La HCC “neoplásica” puede verse en cortes teñidos por hematoxilina-eosina, mientras que la HCC “reactiva” necesita una tinción inmunohistoquímica para identificarla (Perry et al., 1996).

La HCC “neoplásica” generalmente se observa en los dos tercios superiores de los lóbulos laterales junto al carcinoma medular invasor de tipo hereditario y en las piezas de tiroidectomía profiláctica de los portadores de mutaciones de RET en la línea germinal (Yen et al., 2003). En estos casos la HCC (focal, difusa o nodular) se caracteriza por grupos de células C atípicas intrafoliculares que pueden rodear los folículos y provocar obliteración folicular parcial o completa (DeLellis, 1995). Se ha observado un progresivo aumento del índice de proliferación acompañado de un incremento de las alteraciones moleculares y de la monoclonalidad, que evoluciona a carcinoma medular invasor (Matias-Guiu et al., 1995). Se han publicado casos asociada a CMT esporádico (Kaserer et al., 2001).

El diagnóstico diferencial de HCC “neoplásica” incluye la extensión intraglandular del carcinoma medular, nidos celulares sólidos y tiroiditis por palpación. Es muy difícil distinguir la HCC del carcinoma medular microinvasor en casos individuales. Puede ayudarnos la presencia de fibrosis alrededor de los nidos tumorales y estudios especiales de inmunohistoquímica o microscopía electrónica para confirmar la rotura de la membrana basal folicular (McDermott et al., 1995). La HCC suele mostrar mayor reactividad para la tinción inmunohistoquímica de calcitonina que el carcinoma invasor (Matias-Guiu et al., 2004).

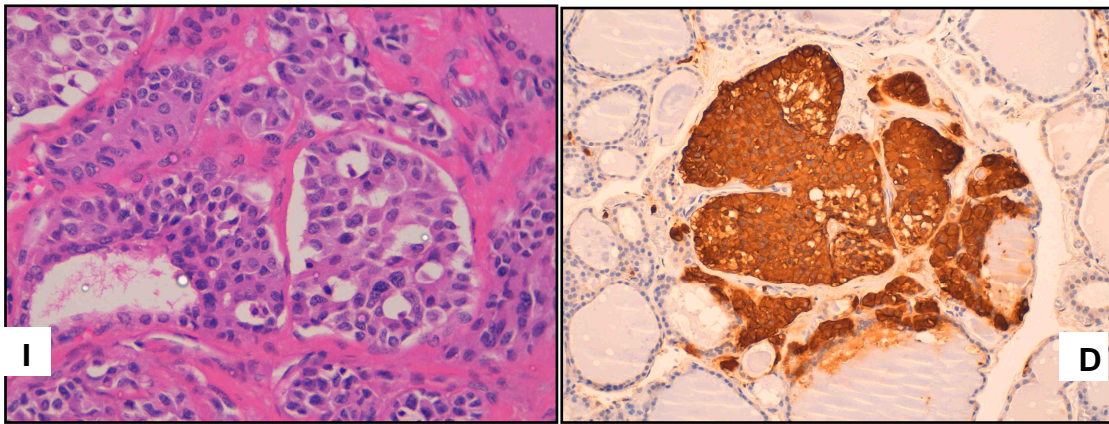


Fig. 3: Imagen microscópica de la HCC. I: ocupación focal y nodular del folículo tiroideo por HCC, en un caso de CMT esporádico. Tinción de H-E. (400x). D: hiperplasia de células C focal y difusa y nodular, en un caso de CMT familiar. Tinción inmunohistoquímica de CEA. (100x).

La HCC "reactiva" se caracteriza por un incremento de las células C de aspecto normal. Solo de forma excepcional oblitera, focalmente, los folículos. Se ha descrito incremento de las células C, en un gran grupo de trastornos fisiopatológicos, como son: los cuadros de hiperparatiroidismo, pacientes con hipergastrinemia, tiroiditis linfocítica y al lado de varios tumores foliculares. También en el envejecimiento. El potencial maligno de esta HCC (conocida como reactiva, secundaria o fisiológica) no se ha demostrado completamente, aunque hay ejemplos asociados a CMT esporádico (Livolsi and Feind, 1979).

Con la ayuda de estudios ultraestructurales de muestras con HCC nodular, se ha visto que existen defectos en la lámina basal con invasión y fibrosis de los límites del tumor, lo cual, se ha interpretado como una probable transición inminente al CMT microscópico precoz. (De Lellis et al 1977).

La HCC se considera una lesión preneoplásica y precede al desarrollo del CMT hereditario, sin embargo su papel en el CMT esporádico está menos claro. Nosotros hemos observado HCC asociada a algunos casos de tumores esporádicos de la serie estudiada, como puede verse en la Fig. 3 izquierda. Algunos autores han propuesto que la mutación aislada de RET es suficiente para causar HCC (Diaz-Cano et al., 2001). Sin embargo, la

progresión del tumor probablemente se produce como resultado de la acumulación de otras alteraciones genéticas somáticas, entre las que se incluyen el desequilibrio cromosómico (encontrado en más de la mitad de los casos) (Taccaliti et al., 2011) y mutaciones de otros posibles genes candidatos (Matias-Guiu et al, 2004).

1.1.3 Histogénesis

En 1966, Williams sugirió que el CMT derivaba de las células C, Bussolati y colaboradores, demostraron la producción de calcitonina en las células tumorales por inmunofluorescencia y en 1973, Wolfe describió la HCC en la vecindad del CMT familiar, identificándola como la lesión precursora del carcinoma medular hereditario. Sin embargo la demostración de células C en pacientes con Síndrome de Di George ha aumentado la posibilidad de que, un pequeño grupo de células C, deriven del ectodermo (Burke et al., 1987).

1.1.4 Alteraciones genéticas.

Se ha demostrado pérdida de heterozigosidad de los marcadores en el 1p (42%), 3p (30%), 3q (38%), 11p (11%),13q (10%),17p (8%) y 22q (29%). Alrededor del 30% de los tumores muestran aneuploidia por citometría de flujo estática. En algunos estudios la aneuploidía y altas fracciones de crecimiento se ha asociado a peor pronóstico (Matias-Guiu et al ,2004).

Se ha mencionado previamente que las formas de CMT hereditario muestran una mutación germinal del protooncogén RET. Los CMT esporádicos presentan mutación somática de RET en el 25%-50% de los casos (Marsh et al., 1996; Figlioli et al., 2013). El espectro de lesión molecular va desde mutaciones puntuales a delecciones de mayor o menor longitud (Elisei et al., 2007; Elisei et al., 2008).

Las mutaciones de RET son muy importantes en el desarrollo del CMT y se amplían en el capítulo 2.

Los casos de CMT que no portan mutación de RET pueden presentar alteraciones en el número de copias de otros muchos genes (Ye et al., 2008). Se han descrito algunos casos de mutaciones en el oncogén K-RAS y en B-RAF (Goutas et al., 2008). También se han observado reordenamientos de B-RAF en el 40% de CMT esporádicos (Ciampi and Nikiforov, 2005; Dibb et al., 2004). El efecto de las alteraciones genéticas observadas en RAS/RAF es difícil de valorar, en algunas ocasiones las consecuencias han sido opuestas: disminución de la proliferación en células de CMT (Nakagawa et al., 1987) o desarrollo de CMT en ratones transgénicos (Johnston et al., 1998).

Recientes estudios han aportado más información de otras alteraciones moleculares. Un subgrupo de CMT muestra expresión aumentada del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y mayor número de copias de los genes de la vía EGFR así como aumento de su activación. Sin embargo las mutaciones de EGFR en el dominio tirosina quinasa son escasas (Rodríguez-Antona et al., 2010).

Se han estudiado los perfiles de expresión en 2 grupos de CMTs, esporádicos y hereditarios. Se ha documentado una lista de 360 genes expresados de forma significativamente diferente. De todos ellos destacan cinco genes: PROM1, GFRA1, LOXL2, DKK4 y GAL; los 4 primeros relacionados con la mutación de RET M918T y GAL relacionado con la mutación de RET 634, que parecen ser los biomarcadores de condiciones genéticas diferentes (Maliszewska et al., 2013).

Por otro lado, varias evidencias apoyan la activación de la vía de señales Akt/ mTOR (Kouvaraki et al., 2011; Tamburrino et al., 2012).

También se han observado alteraciones epigenéticas como hipermetilación del promotor (7,3% de los casos de CMT estudiados) de varios genes relacionados con la señalización y vías de la iodina (Schagdarsurengin et al., 2002) o hipometilación del promotor tanto de oncogenes como de genes supresores tumorales (5,2% de los casos estudiados). Entre ellos destacan dos genes INSL4 (60%) y DPPA2 (30%) que muestran alta frecuencia de hipometilación (Rodríguez-Rodero et al., 2013).

1.1.5 Tratamiento

El tratamiento del CMT es quirúrgico. Se acepta que la tiroidectomía total debe ir siempre asociada a disección del compartimento central del cuello. La disección ganglionar lateral puede hacerse en todos los casos o reservarse para los pacientes con afectación ganglionar. Ha de valorarse que los ganglios linfáticos metastásicos se detectan con bastante dificultad, tanto en el preoperatorio por medio de ultrasonidos, como en la inspección visual del cirujano. Además, las reintervenciones se asocian a un alto índice de complicaciones (Lupone et al., 2012). La microdisección compartimentalizada orientada de los ganglios linfáticos del cuello ha mejorado, significativamente, los resultados de la cirugía primaria. Incluso tras la aplicación de esta cuidadosa cirugía, queda un grupo de pacientes (20%) con enfermedad residual o recurrente (Al-Rawi and Wheeler, 2006).

El momento para practicar la tiroidectomía en los portadores asintomáticos es durante el primer año de vida en los MEN2B y a los 5 años de edad en los MEN2A y CMTF. Si los padres no aceptan la cirugía precoz, se ha propuesto hacer un seguimiento de los niños, con prueba de valoración de los niveles de calcitonina tras la estimulación con pentagastrina, y operar en el momento en que sea anormal (Brandi et al., 2001).

Las complicaciones post-quirúrgicas más frecuentes son el hipoparatiroidismo post-quirúrgico permanente y la lesión del nervio laríngeo. No se ha visto que mayor incidencia en la infancia que en los adultos. El tratamiento médico post-quirúrgico precisa administración de levotiroxina oral a la dosis correspondiente para mantener normales los niveles de TSH. No está indicada la supresión de la TSH (Heshmati et al., 1997). También se realiza cirugía de las metástasis (Al-Rawi and Wheeler, 2006).

1.1.5.1 Tratamiento del CMT irresecable o metastásico

El tumor es relativamente insensible a la radiación y a la quimioterapia convencional. Por eso, la terapia farmacológica del CMT es objeto de una intensa experimentación. La mayoría, son investigaciones en líneas celulares y en modelos de animales. Recientemente se ha producido un avance tras el tratamiento de los pacientes con anilinoquinazole ZD6474 (Vandetanib) que actúa inhibiendo RET por medio de EGFR y del receptor del factor de crecimiento vascular (VEGFR, de Vascular Endothelial Growth Factor Receptor). VEGF se une al VEGFR en la superficie extracelular provocando angiogenesis alrededor del tumor. La inhibición de VEGFR2 por medio de Vandetanib, puede frustrar el crecimiento tumoral. Solo se administra en casos de enfermedad diseminada porque provoca importantes efectos secundarios (Deshpande et al., 2012).

Se están probando nuevos fármacos contra dianas terapéuticas, en algunos ensayos clínicos. Entre estos fármacos destacan inhibidores tirosinquinasa como: Carbozantinib (XL184), Motesanib, Axitinib, Sorafenib, Sunitinib e Imatinib y fármacos como Capecitabina, (un inhibidor timidilato sintetasa) que se ha probado en CMT metastático, con respuesta parcial o estabilización de la enfermedad (Sugawara et al., 2009; Deshpande et al., 2012; Wells et al., 2012)

Entre los últimos estudios destacan la identificación de los perfiles de expresión de varias dianas potencialmente importantes, como son: COX-1/2, Bcl-2^a, Gst- π , Gli-1, Gli-2, Gli-3, y Bmi-1 (Erovc et al., 2012). Un posible candidato para diana terapéutica es mTOR. Se ha observado el bloqueo indirecto (tras uso de inhibidores de PI3K “in vitro”) y también, apoptosis y disminución la viabilidad de las líneas celulares de CMT tras el bloqueo directo (Gild et al., 2013).

Asímismo, se está probando un nuevo tipo de radioterapia radiopéptido-dirigida a dosis subtóxicas de radioactividad, que está en fase experimental, y parece prometedora (Divgi, 2011). El perfil de expresión inmunohistoquímica de

los receptores de somatostatina (SSTRs) puede tener relevancia clínica para el posterior tratamiento con radionucleidos péptido receptor (Erovic et al., 2012).

1.1.6 Pronóstico

La angiоinvasión tumoral (observada en el 43% de los casos) se ha considerado el factor predictivo de recurrencia, enfermedad o muerte más fiable. Todos los CMT angiоinvasores presentan metástasis loco-regionales y un 60% a distancia (Rohmer et al., 2011 ; Pilaete et al., 2012;). Sin embargo, en los análisis multivariante, la edad del paciente al inicio del tratamiento y el estadio de la enfermedad son los indicadores independientes de supervivencia más significativos (Scopsi et al, 1996; Kebebew et al, 2000).

Algunas alteraciones moleculares son importantes factores pronósticos. La más destacada es la mutación M918T, relacionada con mayor agresividad (Elisei et al., 2008), y de menor valor un ejemplo opuesto, el polimorfismo CDKN1B V109G en el CMT esporádico, que condiciona un pronóstico más favorable (Pasquali et al., 2012).

El CMT todavía muestra muchos aspectos controvertidos relacionados con el diagnóstico y su manejo terapéutico.

1.2 RET

El gen RET codifica un receptor tirosinquinasa (RTK) esencial en el desarrollo del riñón, de los sistemas nervioso central y periférico (las neuronas noradrenérgicas y dopaminérgicas), así como, en la maduración de las espermatogonias. Y es imprescindible en el desarrollo de algunos tejidos neuroendocrinos, entre los que destacan las células C del tiroides y la médula adrenal. Su mayor expresión se observa en las células de la cresta neural, estructuras embrionarias derivadas de la cresta neural y en los estadios más tempranos de inducción y morfogénesis renal. Más tarde disminuye, a niveles

bajos, en los tejidos adultos (Shuchardt et al., 1994; Lodish and Stratakis, 2008).

La proteína RET es el receptor para los ligandos de la familia GDNF (GFLs), que incluye a 4 factores de crecimiento polipeptídicos: GDNF (de Glial-cell-line Derived Neurotrophic Factor), NRTN (Neurturina), ARTN (Artemina) y PSPN (Persefina). RET transmite al interior de la célula las señales extracelulares de un complejo multimolecular al que se unen los GFLs. Los distintos miembros de la familia de ligandos de GDNF (GDNF, NRTN, PSPN y ARTN) fueron caracterizados como inductores de la actividad de RET por varios autores (Airaksinen et al., 1999; Saarma and Sariola, 1999; Saarma, 2000).

1.2.1 El receptor RET

RET es el acrónimo de REarranged \square uring Transfection y se identificó como un nuevo oncogén en el año 1985, al realizar un experimento de transfección de células NIH3T3 con DNA aislado de células del linfoma T humano. En la transfección se producía la recombinación entre dos secuencias de DNA, no relacionadas, cuyo producto era este nuevo gen transformante (Takahashi et al., 1985).

La investigación sobre RET ha aportado numerosos datos sobre el desarrollo de algunos cánceres y malformaciones congénitas. Y ha permitido conocer mejor algunos pasos de la formación del sistema nervioso y del riñón.

En los humanos, el gen RET se encuentra en el cromosoma 10 (10q11.2) y comprende 21 exones (Ishizaka et al., 1989).

1.2.2 Estructura

RET es un RTK transmembrana cuya estructura comprende tres dominios: un dominio extracelular de unión al ligando, el cual incluye cuatro repeticiones

de tipo cadherina y un dominio rico en cisteínas (CRD), otro dominio hidrofóbico transmembrana y el tercero que corresponde a una porción citoplasmática con un dominio encargado de su actividad tirosinquinasa separado en dos regiones (Fig. 4). El dominio extracelular de RET contiene varios puntos de glicosilación (Carter et al., 2001; Iwamoto et al., 1993; Myers et al., 1995; Tahira et al., 1990; Takahashi et al., 1993; Takahashi et al., 1989; Takahashi et al., 1988; Takahashi and Cooper, 1987)

Por mecanismos de “splicing” alternativo de RET se generan al menos 3 isoformas (Tahira et al., 1990; Myers et al., 1995) que tienen en común desde el primer aminoácido hasta el residuo en la posición 1063. A partir de éste, se diferencian en el número de residuos de su extremo C-terminal dando lugar a tres isoformas: larga (RET51), intermedia (RET43) y corta (RET9) (Hansford and Mulligan, 2000).

1.2.3 Mecanismos de activación de RET

En las neuronas se han descrito dos mecanismos de activación de RET (Airaksinen and Saarma, 2002^a, b; Tansey et al., 2000; Trupp et al., 1997).

RET no puede unirse a GDNF por si mismo, pero lo hace por medio de su unión al complejo formado por GDNF y GFR α 1 (Jing et al., 1996). En el primer paso, el ligando, en forma de homodímero, da lugar a la formación de un complejo de alta afinidad con un homodímero de su correspondiente GFR α los que debido a su “ancla” de GPI, se encuentran localizados en los microdominios de la membrana plasmática llamados Lipid Rafts (balsas lipídicas). Este conjunto tetramérico recluta a dos moléculas de RET que al juntarse sufren el proceso de auto-fosforilación cruzada en residuos tirosina específicos de su dominio intracelular, iniciando así las cascadas de señalización hacia el núcleo celular (Airaksinen et al., 1999; Sariola and Saarma, 2003)(Fig. 4).

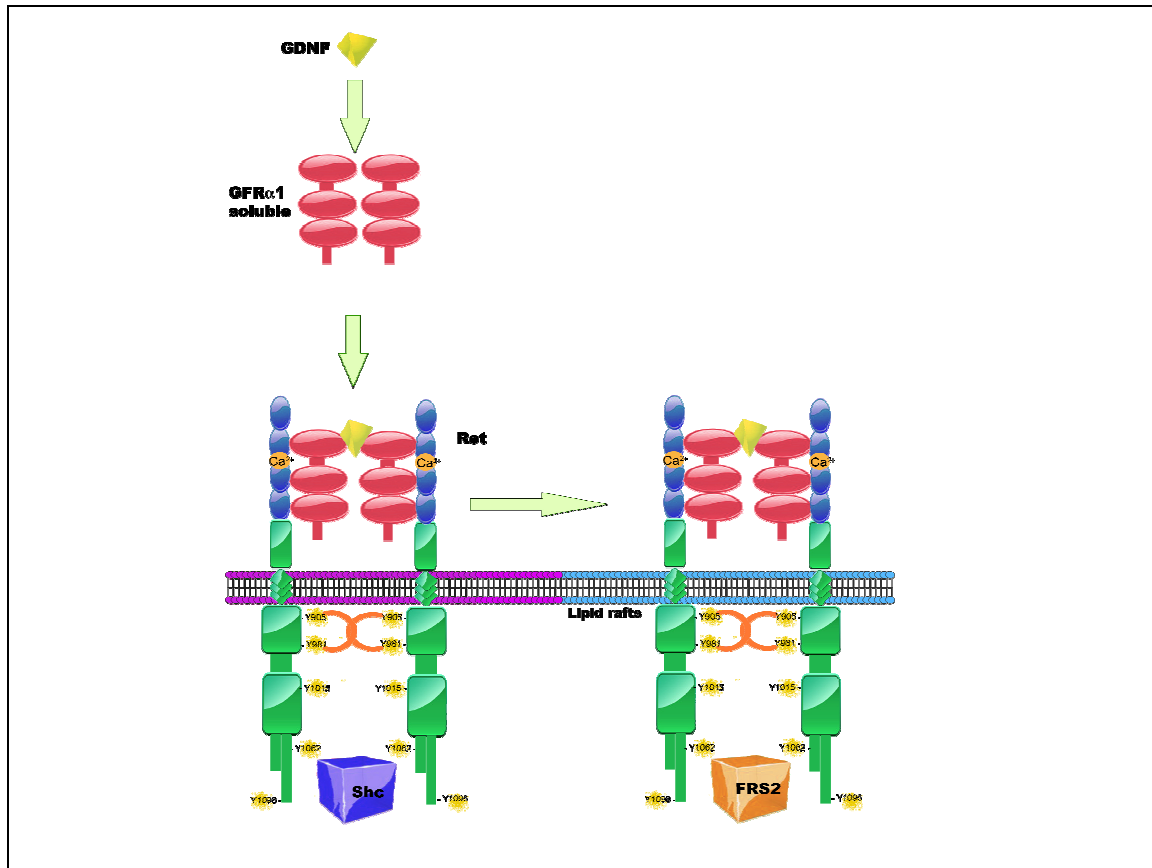


Fig 4: Modelo esquemático de la activación con la presencia de ligando de la señalización de RET: En este caso los dímeros de GDNF se unen a moléculas solubles de GFRα1, formando los complejos tetraméricos que ahora pueden interactuar y activar RET, tanto en el contexto Lipid Rafts como fuera de ellos. Cuando RET se activa en los Lipid Rafts, FRS2 es el el mediador de señales y si está fuera el mediador de la señalización es Shc (modificado de Arighi, E et al. 2005).

1.2.4 Regulación de la actividad de RET

RET es un receptor estrictamente regulado para que las señales tengan la intensidad y duración adecuadas. Uno de los mecanismos más comunes de control consiste en su degradación por medio de ligasas de ubiquitina E3 como Cbl (de Casitas B-lineage Lymphoma) que necesita unirse al complejo Shc y a Grb2 (Scott et al., 2005). Existe otro mecanismo, todavía no aclarado, para la degradación de RET que depende del proteosoma. Los Lipid Rafts

secuestrarían a RET activado evitando la degradación por el proteosoma y aumentando el tiempo de vida media de su actividad señalizadora (Pierchala et al., 2006; Pierchala et al 2007). También se han descrito mecanismos de desfosforilación del receptor por medio de proteínas fosfatasas de tirosinas como LAR (de Leucocyte common Antigen-Related), SHP1 (de Protein tyrosine Phosphatase 1) y RPTP1J (de Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase 1J) capaces de interactuar con algunas variantes oncogénicas de RET y de reducir su actividad señalizadora y transformante (Hennige 2001; Qiao et al., 2001; Iervolino et al., 2006;). Asimismo, se han descrito varios mecanismos que regulan negativamente a RET o sus vías de señalización. En el primer caso, se ha descrito una proteína denominada Lring, que se asocia al receptor e impide su activación (Liu and Xing, 2008) en el segundo caso, varios estudios indican que las proteínas de la familia Sprouty (Spry) regulan la señalización mediada por GDNF/RET (Basson et al., 2005; Basson et al., 2006; Ishida et al., 2007; Jin et al 2009; Michos et al 2010).

1.2.5 Consecuencias moleculares de la activación de RET

Como se ha mencionado previamente, RET activa diferentes cascadas de señales intracelulares que regulan supervivencia celular, diferenciación, proliferación, migración, quimiotaxis, morfogénesis y crecimiento de neuritas y/o plasticidad sináptica. La estimulación de RET origina un proceso de fosforilación en residuos de tirosina específicos del dominio intracitoplasmático (Martin-Zanca et al., 1986; Pierotti et al., 1995 ; Fink et al., 1996; Coudrier et al., 2002). Existen 16 tirosinas en la parte intracelular de RET9 y 2 adicionales en la de RET51. La autofosforilación de algunas de ellas es indispensable para la señalización mediada por RET. Se han identificado las Tyr905, Tyr981, Tyr1015, Tyr1062 y Tyr1096 como los sitios de unión para diferentes moléculas adaptadoras/ejecutoras que activarán, a su vez, todo un grupo de vías de señalización intracelulares que posteriormente desencadenarán los efectos biológicos ya mencionados. Así las proteínas adaptadoras Grb7/Grb10 se unen a Tyr905; Src, c-Abl y la isoforma SH2-B β interaccionan con Tyr981; Fosfolipasa C- γ (PLC- γ , isoforma de PLC) lo hace con Tyr1015 y la proteína

adaptadora por excelencia Grb2, se une a Tyr1096 de RET51 (Alberti et al., 1998; Borrello et al., 1996; Encinas et al., 2004; Lavarone et al., 2006; Pandey et al., 1995; Pandey et al., 1996). Tyr1062 es un residuo de particular importancia, ya que actúa como sitio de acoplamiento múltiple para diferentes moléculas de señalización, como Shc/Rai, FRs2, IRS1/2, las proteínas adaptadoras Dok1, Dok4/5, Dok6, Enigma, PKC α y Shank3 (Andreozzi et al., 2003; Arighi et al., 1997; Asai et al., 1996; Crowder et al., 2004; Durick et al., 1996; Hennige et al., 2000; Kurokawa et al., 2001; Lorenzo et al., 1997; Melillo et al., 2001a; Melillo et al., 2001b; Murakami et al., 2002; Ohiwa et al., 1997; Pelicci et al., 2002; Crowder et al., 2004)

Tras la estimulación de RET por la vía normal o por medio de sus variantes oncogénicas (Asai et al., 1996; Mercalli et al., 2001) se activan como mínimo dos complejos de señalización que se ensamblan alrededor de la Tyr1062, uno de ellos, activa la vía RAS/ERK/MAPK y el otro la cascada PI3K/Akt (Hayashi et al., 2000).

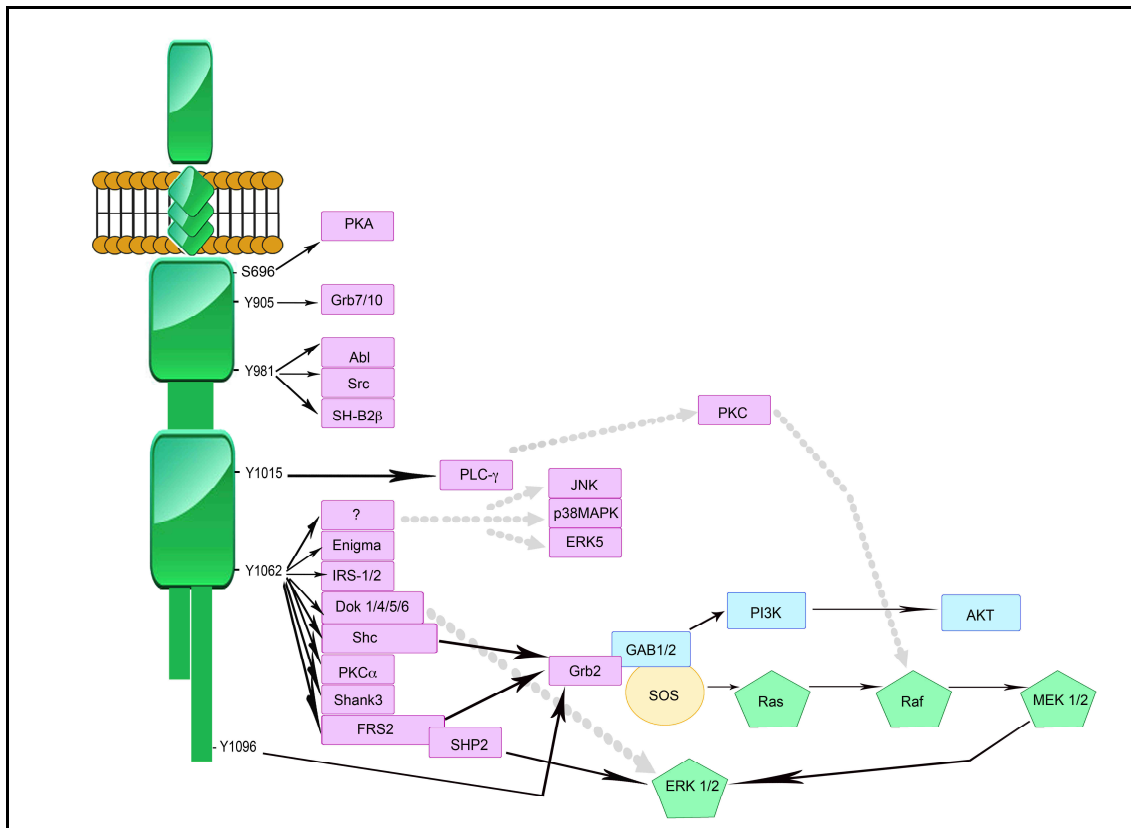


Fig. 5: Mecanismos de señalización intracelular inducidos por GDNF/RET: Esquema de las proteínas adaptadoras y efectoras que se unen a los dominios intracelulares de RET, que son críticos para su señalización, y las principales cascadas moleculares que se activan (modificado de Arighi, E. et al., 2005 y de Ichihara, M. et al., 2004).

1.2.6 Vías de transducción de señales mediadas por RET

1.2.6.1 Vía RAS/RAF/ERK

La estimulación de RET activa distintas vías de señalización intracelular entre las que destacan la vía RAS/RAF/ERK (Santoro et al., 1994; van Weering et al., 1995; Worby et al., 1996), la cascada PI3K/Akt implicada en supervivencia celular (Segouffin-Cariou and Billaud, 2000; van Weering and Bos, 1997; Maeda et al., 2004) y las vías Cdc42/JNK (Chiariello et al., 1998), p38MAPK (Kurokawa et al., 2003), ERK5 (Hayashi et al., 2000) y PLC-γ (Borrello et al., 1996).

La cascada RAS/RAF/MAPK es el modelo mejor estudiado. Se inicia cuando el complejo Grb2-SOS es reclutado por las moléculas adaptadoras Shc o FRS2 unidas a la fosfoTyr1062 de RET. Tras su activación Grb2-SOS promueve el intercambio de una molécula del ribonucleótido GDP por una GTP en la pequeña proteína G RAS, desencadenando su activación, que se traduce en la fosforilación de RAF. Esta, a su vez, fosforila y activa a MEK1/2 lo que determina la activación de las quinasas ERK1/2, que se translocarán al núcleo celular para modular la actividad de diversos factores de transcripción y, tendrá como consecuencia, la expresión de aquellos genes diana requeridos para las distintas funciones biológicas mencionadas.

Las proteínas de la familia RAF (formada por tres treonina-kinasas: a-RAF, b-RAF y c-RAF) tienen un papel crítico en la vía de señalización ERK/MAPK (Avruch et al., 1994). Esta familia de enzimas, de la que destacamos b-RAF, está sujeta a una compleja regulación (Barnier et al., 1995) y las mutaciones activadoras lo transforman en un oncogén muy común en cánceres humanos (Kimura et al., 2003). Ya hemos mencionado el efecto contradictorio en CMT.

1.2.6.2 Vía PI3K/Akt

PI3K/Akt es una de las 2 posibles vías activadas por la señalización de Tyr1062 de RET (Kurokawa et al., 2001). El complejo adaptador Grb2-SOS constituye un punto de bifurcación en la señalización inducida por Tyr1062 de RET, porque puede reclutar, alternativamente, a Gab 1/2, las cuales interactúan directamente con la subunidad p85 de PI3K, intermediario necesario para la posterior activación de Akt por PDK1 y PDK2 (Fig. 6).

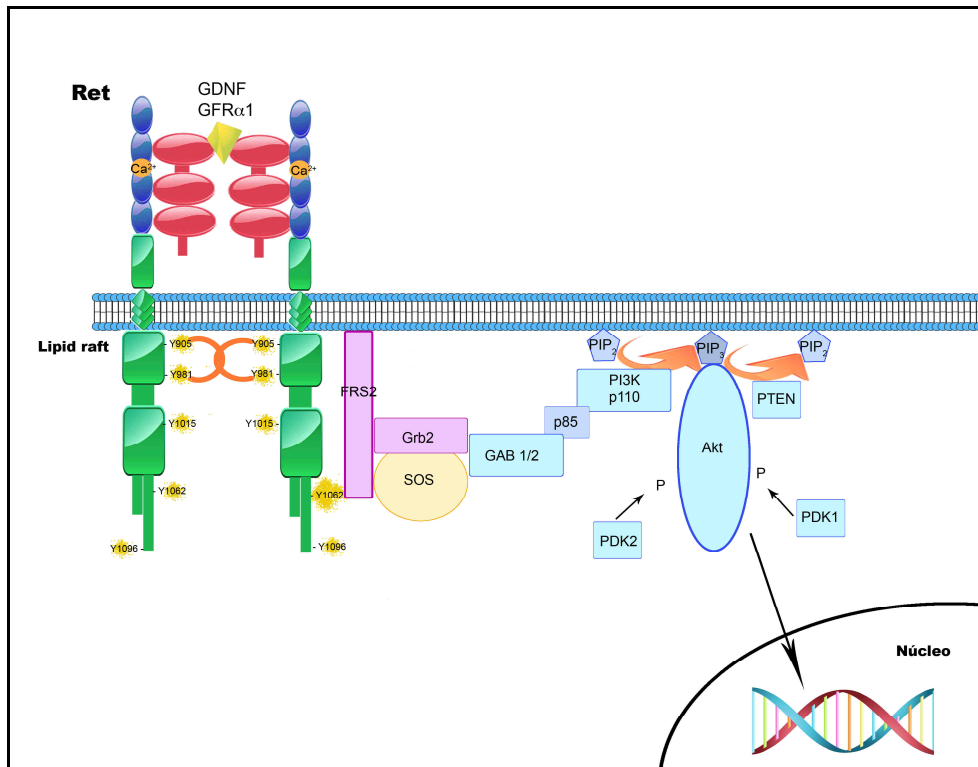


Fig. 6: Modelo esquemático de la vía de señalización PI3K/AKT. Uno de los genes regulados por esta vía es NF-κB.

1.2.7 RET en cáncer de tiroides

En 1987 se publicó la primera evidencia del papel oncogénico de RET al relacionarlo con el carcinoma papilar de tiroides (CPT) (Fusco et al., 1987). Las alteraciones más frecuentes consisten en reordenamientos cromosómicos que generan hasta 12 variantes de oncogenes quiméricos denominados RET/CPT por la fusión del dominio tirosinquinasa de RET con genes heterólogos resultando en su dimerización independiente de ligandos. En el epitelio folicular del tiroides, donde normalmente RET no se expresa, permiten la expresión de las proteínas quiméricas que están constitutivamente activadas y actúan como oncoproteínas (Arighi et al., 2005; Asai et al., 2006).

1.2.8 RET en el carcinoma medular de tiroides

CMT se asocia entre otras alteraciones moleculares a mutaciones puntuales de RET. Como se ha mencionado previamente las mutaciones puntuales de RET, en la línea germinal, son las responsables de los síndromes MEN2 (DeLellis, 1995; Pasini et al., 1996). Las mutaciones observadas se asocian a tres niveles de predisposición para desarrollar CMT. El primer nivel corresponde a las mutaciones en los codones 609, 768, 790, 804 y 891 que desarrollan tumores tardíos y de crecimiento lento. El segundo nivel corresponde a las mutaciones en los codones 611, 620 y 634, caracterizado por la presencia de HCC y posterior CMT después de los 5 años y el tercer nivel corresponde a las mutaciones 918 y 883 que desarrollan CMT agresivos a edad muy temprana (Kodama et al., 2005; Santoro et al., 2004).

Por otro lado estas mutaciones se incluyen en dos grupos principales: las que afectan al dominio extracelular de RET (MEN2A) y las que involucran al dominio tirosinquinasa (CMTF y MEN2B). Las mutaciones MEN2A causan la sustitución de cisteínas extracelulares en los codones 609, 611, 618, 620, (del exón 10), 630 o 634 (del exón 11). La mayoría de pacientes con MEN2A muestran la mutación de Cys 634. Las mutaciones CMTF son similares a las que causan MEN2A pero están distribuidas más homogéneamente entre las cisteínas 609, 618 y 620 (Donis-Keller et al., 1993; Mulligan et al., 1995). MEN2B se produce por las mutaciones altamente específicas Met918Thr (95%) y Ala883Phe (<5%) ubicadas en el subdominio tirosinquinasa 2 (Carlson et al., 1994; Gimm et al., 1997). RET mutado en el CMT se activa en ausencia de ligando.

La expresión de los receptores RET en la superficie celular que portan mutaciones en el codón 609, 611, 618 o 620 es menor que la expresión de los receptores RET con mutación 634 lo que sugiere que las mutaciones mencionadas previamente disminuyen el transporte de los receptores RET mutados a la membrana plasmática (Chappuis-Flament et al., 1998). Todas estas mutaciones tienen el efecto de ganancia de función. RET mutado en

residuos cisteína en el dominio extracelular muestra dimerización constitutiva (Asai et al., 1995; Borrello et al., 1996; Santoro et al., 1995). Normalmente, estos residuos forman puentes disulfuro intramoleculares, de tal manera que la mutación provoca que una cisteína quede desaparejada y puede establecer interacciones moleculares con otra molécula de RET que posee la misma mutación. Cada una de las mutaciones está asociada a la disminución en la maduración, y muestran diferente capacidad para inducir dimerización, lo cual explicaría los diferentes fenotipos que cada una ocasiona.

La mutación MEN2B Met918Thr, causa cambios cuantitativos en la actividad quinasa de RET y cambios cualitativos a nivel de las señales intracelulares activadas por el receptor (Santoro et al., 1995). Se ha sugerido que este residuo alteraría la selectividad de RET por sus sustratos, (Donis-Keller et al., 1993; Songyang et al., 1995; Pandit et al., 1996) lo que podría afectar al patrón de fosforilación de proteínas involucradas en la transducción de señales (Santoro et al., 1995; Yu et al., 1998; Salvatore et al., 2001). La mayor agresividad de esta mutación se debe a la combinación de dos procesos; por una parte la activación de su función quinasa de manera independiente de ligando y sin la necesidad de formar dímeros y, por otra parte, a la especificidad de los sustratos intracelulares de RET (Salvatore et al., 2001) Se ha observado que RET mutado Met918Thr está ya activo en el retículo citoplasmático, donde interactúa con las proteínas adaptadoras (Runeberg-Roos et al., 2007).

En los CMTs esporádicos se observan mutaciones somáticas de RET en el tejido tumoral del 23% al 54% de los casos (Dvorakova et al., 2008; Gimm et al., 1999). El espectro de lesión molecular va desde mutaciones puntuales a delecciones de mayor o menor longitud (Elisei et al., 2008).

Las mutaciones activadoras de RET provocan desequilibrio alélico e impiden la apoptosis, teniendo como consecuencia un acúmulo de alteraciones moleculares. La consiguiente formación de un tumor puede ocurrir por un “second hit”, que cause un efecto dominante del alelo mutado, debido a la pérdida del alelo normal o al aumento de copias del alelo mutado (Huang et al.,

2003). En varios estudios realizados, en la línea celular TT de CMT, se ha demostrado que el desequilibrio alélico entre RET normal y mutado es el posible mecanismo de formación del tumor (Marsh et al., 2003). Otras alteraciones posteriores a la mutación de RET, del tipo de deleciones o amplificaciones cromosómicas como una posible deleción del cromosoma 1p, podrían ser otro de los pasos en la formación del tumor (Mulligan et al., 1993; Ye et al., 2008).

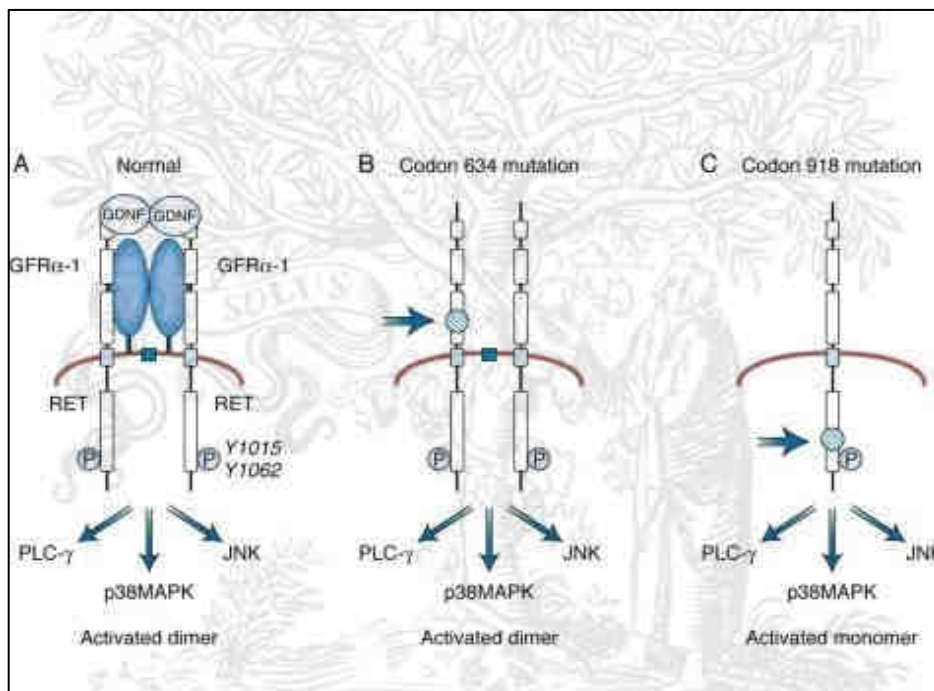


Fig. nº 7: Esquema de las formas de activación de RET: normal (GDNF/RET) y tras las 2 mutaciones más comunes: 634 (activación dimérica sin necesidad de ligando) y 918 (activación monomérica sin ligando) de Henry M. Kronenberg; Shlomo Memed; Kenneth S. Polonsky; P. Reed Larsen. Multiple Endocrine Neoplasia. Page: 1728, in Williams Textbook of Endocrinology.

Hay poca información disponible sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la potente acción transformante y mitogénica de RET. Como se ha mencionado previamente, tras la fosforilación, es muy probable que se alteren las señales inferiores. El papel de la señalización de RAS es probablemente complejo y los distintos miembros de la familia RAS pueden ejercer efectos diferentes. Los escasos análisis genéticos sistemáticos de la

cascada PI3K-AKT , realizados en CMT, han encontrado infrecuentes mutaciones (Cerrato et al., 2009). En casos de MEN2B, algunos de los estudios muestran posibles cambios en la especificidad del sustrato de RET al compararlo con el receptor normal I(Wells and Santoro, 2009). Se trata de fosforilación de paxilina y otras proteínas asociadas a las proteínas de señales Crk y Nck y la unión preferente a otras proteínas adaptadoras como Dok1 o JNK.(Murakami et al., 1999). En estudios celulares se ha demostrado que la vía JNK está involucrada en la habilidad de las células RET/MEN2B para metastatizar (Marshall et al., 1997). También se ha sugerido que la señalización de β -catenina juega un papel en la progresión de los tumores y está mediada por RET (Gujral et al., 2008).

1.3. FACTOR NUCLEAR kappaB

El factor de transcripción nuclear kappaB (NF- κ B) se descubrió en 1986, en el laboratorio del Dr. David Baltimore. Allí observaron que actuaba como modulador de la transcripción de la cadena ligera de las inmunoglobulinas en los linfocitos B (Sen and Baltimore, 1986). Estudios posteriores han demostrado que NF- κ B es una familia de proteínas, de expresión ubicua, implicadas en la regulación de diversos procesos celulares como: inflamación, adhesión, diferenciación, proliferación, apoptosis y oncogénesis.

1.3.1 Estructura y función

NF- κ B es una familia de factores de transcripción, estrechamente relacionados entre si, que incluye cinco genes NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), Rel A (p65), c-rel y Rel B. Estos cinco genes codifican 7 proteínas distintas que muestran un dominio de homología Rel (RHD (de Rel Homology Domain) común en posición N-terminal. RHD se encarga de la formación de dímeros, de la interacción con sus inhibidores específicos y de la unión al DNA. Hay dos tipos de proteínas de NF- κ B (Karin and Ben-Neriah, 2000). Las 3

proteínas conocidas como Rel A/p65, c-rel y Rel B forman la subfamilia I. Se sintetizan como formas maduras. y contienen un dominio de activación transcripcional, denominado TAD, necesario para regular, de forma positiva la expresión génica. La subfamilia II está formada por 2 elementos NF- κ B1 (p50/p105) y NF- κ B2 (p52/p100) que se sintetizan en sus formas precursoras. Las formas precursoras (p100 y p105) contienen repeticiones de dominios anquirina (de ankyrin repeat) en posición C-terminal y sufren proteólisis en el proteosoma dando lugar a la producción de las proteínas maduras p50 y p52. Ambas contienen dominio de unión al DNA pero les falta el dominio de activación transcripcional (Dolcet et al., 2005a).

En la mayoría de las células, los dímeros NF- κ B están situados, predominantemente en el citoplasma, unidos a los inhibidores de NF- κ B (I κ Bs) y por eso permanecen inactivos. En ausencia de estímulos activadores de la vía NF- κ B, los homodímeros p50 y/o p52 están unidos a los motivos κ B, en los promotores de genes diana, bloqueando su modificación. La activación de la vía promueve el desplazamiento de esos homodímeros, dando lugar a la unión de los dímeros NF- κ B con dominio de activación transcripcional (p65, Rel B o c-rel) que activarán o reprimirán la expresión de genes diana (Ghosh et al., 1998). El heterodímero p65/p50 es la combinación más abundante, en las células de los mamíferos (Ghosh and Karin, 2002) .

NF- κ B puede activarse por varios mecanismos moleculares citoquinas, factores de crecimiento, tirosinquinasa, vías de señalización como las RAS/MAPK y PI3K/AKT (Bonizzi and Karin, 2004). En la vía denominada clásica o canónica (Ouaaz et al., 1999) elegida por citoquinas pro-inflamatorias y las infecciones virales. Los dímeros están formados por p65 o c-rel junto a p50. Estos dímeros permanecen inactivos en el citoplasma por su interacción con las proteínas I κ B (Ghosh and Karin, 2002). Las I κ Bs (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ y Bcl-3) constituyen una familia de proteínas que contienen dominios anquirina, que interaccionan con los dominios RDH de las proteínas NF- κ B. Los tres primeros miembros I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ , interaccionan con los dímeros NF- κ B. Además, son responsables de su retención en el citoplasma. Bcl-3 es un miembro peculiar de esta familia, ya que contiene dominio de trans-activación y puede

interactuar con homodímeros de p-50 y p52, ejerciendo como un coactivador transcripcional. I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ contienen 2 serinas conservadas que se fosforilan por la acción de las kinasas de I κ B (IKKish). Tras la fosforilación I κ B sufren una degradación proteosoma-dependiente. IKK es un complejo formado por las subunidades catalíticas IKK α , IKK β y la subunidad reguladora IKK γ (Fig.8). Tras la separación de sus inhibidores, NF- κ B se transloca al núcleo donde actúa como factor de transcripción (Dolcet et al., 2005^a).

La vía alternativa se activa por varios miembros de familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Los dímeros contienen las subunidades Rel B y p100. Esta vía, activa principalmente IKK α , que fosforila p100 y tras sufrir proteólisis da como resultado la forma p52 madura (Senftleben et al., 2001; Xiao et al., 2004; Liang et al., 2006) Entonces los dímeros Rel B/p52 se traslocan al núcleo y pueden activar la transcripción de genes diana específicos (Fig 8). Entre estos genes diana regulados por la vía no canónica destacan: Cox-2, Ciclina D1, Mn-SOD y Bcl -xL

Aunque ambas vías generan como dímeros más comunes p65-p50, c-rel-p50, Rel B-p52 también pueden formarse homodímeros como p50-p50 y p52-p52. Cada dímero puede regular distintas funciones.

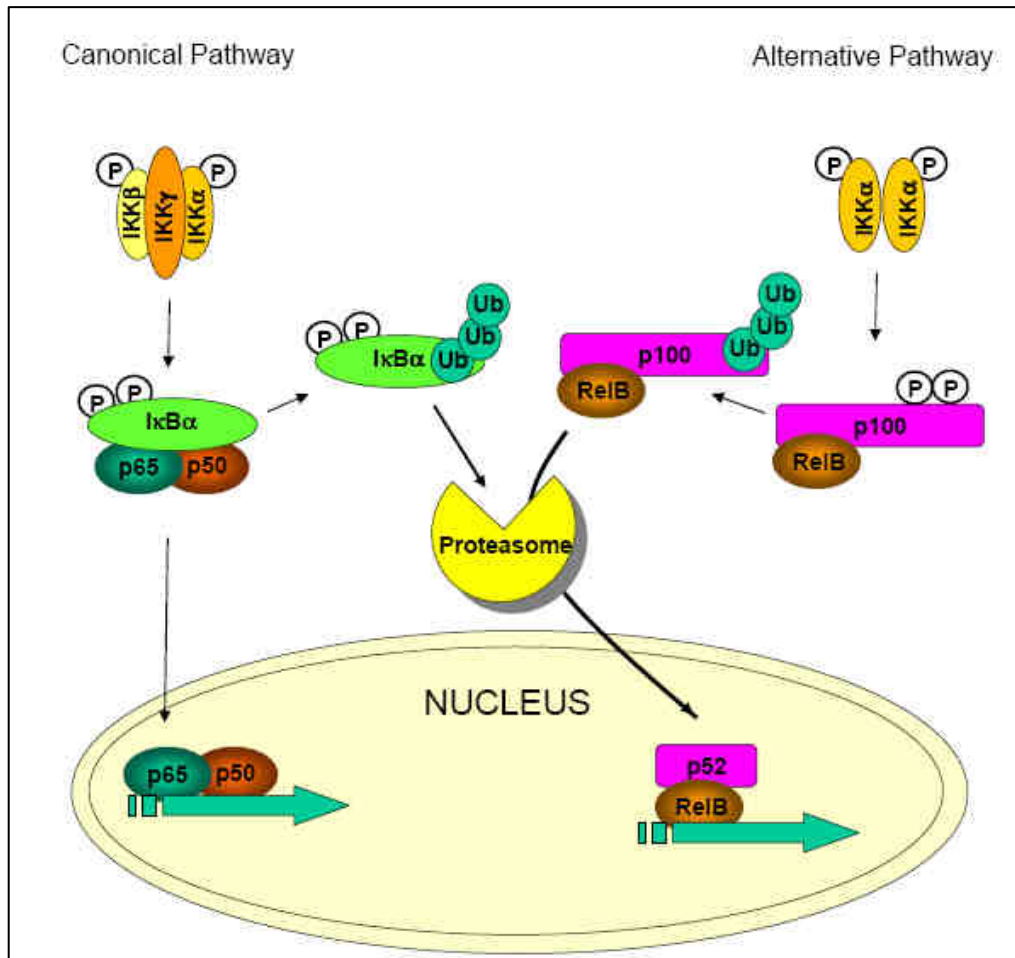


Fig. 8 Modelo de activación del NF-κB. Esquema de la activación por la vía canónica y la vía alternativa.

En el sistema nervioso central, NF-κB muestra una vía de activación atípica mediada por diversos estímulos como: factores neurotróficos, el peróxido o la eritropoyetina (Bui et al., 2001; Aggarwal et al., 2004). Se caracteriza por la fosforilación de IκBα en Tyr 42 y la activación de p65/p50. Una vez fosforilado, IκBα se separa del heterodímero p65/p50, permitiendo que el complejo NF-κB entre en el núcleo y active la expresión de diversos genes, ya mencionados, como Bcl-xL (Bui et al., 2001).

La activación de NF-κB está estrictamente regulada. En las células normales se activa tras los estímulos apropiados, provoca mayor transcripción de los genes diana y vuelve a su forma inactiva. La activación de NF-κB es un proceso inducible y transitorio. Se han descrito varias modificaciones post-transcripcionales de Rel A/p65 que modulan la actividad de NF-κB. Estas

modificaciones pueden estar inducidas directamente por los componentes de la vía o por distintas vías de señalización (Hayden and Ghosh, 2008).

En las células tumorales, diversas alteraciones moleculares pueden afectar la activación de NF- κ B (Baud and Karin, 2001). En ese caso, se pierde la posibilidad de inducirlo y está activado continuamente. Esto conduce a la desregulación de los genes que están bajo su control (Dolcet et al., 2005^a). Entre estos genes, los hay que regulan la apoptosis, el control del ciclo celular, la adhesión y la migración celular. En la siguiente tabla se observa un listado de los genes diana de NF- κ B relacionados con la apoptosis y el ciclo celular (Tabla II).

Genes diana	Función	Referencia
Bcl-2	Anti-apoptótica	(Tamatani et al., 1999)
Bcl-x	Anti-apoptótica	(Tamatani et al., 1999)
Bcl-xL	Anti-apoptótica	(Bui et al., 2001)
c-FLIP	Anti-apoptótica	(Baud and Karin, 2001)
IAPs	Anti-apoptótica	(Chu et al., 1997)
TRAF1	Anti-apoptótica	(Baud and Karin, 2001)
TRAF2	Anti-apoptótica	(Baud and Karin, 2001)
Bax	Pro-apoptótica	(Shou et al., 2002)
Bcl-xs	Pro-apoptótica	(Shou et al., 2002)
p53	Factor de transcripción	(Qin et al., 1999)
c-Myc	Factor de transcripción	(Qin et al., 1999)
Ciclina D1	Regulador del ciclo celular	(Liang et al., 2006)

Tabla II. Genes diana de NF- κ B relacionados con la apoptosis y el ciclo celular.

*En negrita los genes que se han estudiado en esta tesis.

1.3.2 Relación de NF- κ B y cáncer

Hay numerosas evidencias de la relación entre las proteínas Rel /NF- κ B y el cáncer. Los primeros estudios en virus, identificaron alteraciones como la del oncogen v-Rel (homólogo de c-rel) en linfomas y leucemias de pollos y la activación de NF- κ B de forma persistente por el virus de Epstein-Barr,

implicado en el linfoma de Burkitt y en el linfoma de Hodgkin (Dolcet et al., 2005a).

Las proteínas p65, p50 y NF- κ B1 están constitutivamente activadas en una gran variedad de tumores humanos. Destaca la asociación con varios tumores hematológicos como la activación constitutiva de p52 en linfomas B y T, y en el mieloma múltiple (Neri et al., 1991; Neri et al., 1995).

Entre los tumores sólidos, se ha descrito activación en carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Mukhopadhyay et al., 1995), de mama (Cogswell et al., 2000; Sovak et al., 1997) y de endometrio (Pallares et al., 2004). Destaca la evidencia directa de la función de c-rel en la carcinogénesis de mama, en ratones transgénicos, mediante la expresión aumentada de los genes diana de NF- κ B como ciclina D1, c-myc y Bcl-xL. Se ha detectado la presencia nuclear de los dímeros p65/p50 (Romieu-Mourez et al., 2003). El incremento de p65 nuclear está presente en muchos tumores y se ha asociado a progresión tumoral en 2 tipos de neoplasias: carcinoma de células escamosas de cervix (Nair et al., 2003) y carcinoma gástrico (Sasaki et al., 2001).

Por otro lado, se han observado cambios en numerosos genes reguladores de la vía de NF- κ B, que de forma indirecta, provocan la activación constitutiva de NF- κ B. Son bien conocidas la pérdida de función de algunas subunidades IKBs (Rayet and Gelinas, 1999) y la relación con PTEN y RAS, genes frecuentemente mutados en los cánceres humanos.

1.3.3 NF- κ B y cancer de tiroides

Existen escasos estudios sobre las alteraciones de la familia NF- κ B en el cancer de tiroides. Ludwig et al. demostraron la presencia de p65 activa en células TT, una línea celular de CMT humano que expresa la mutación de RET tipo MEN2A, sugiriendo que la activación de NF- κ B está mediada por RET (Ludwig et al., 2001).

En un estudio posterior se demostró la presencia de p65 “in vitro”, y por inmunohistoquímica en varios carcinomas de tiroides (Pacífico et al., 2004). Se encontraron valores ascendentes según el tipo histológico estudiado, mostrando escasa actividad en el CPT, moderada en el carcinoma folicular y muy abundante, casi en el 100%, en el carcinoma anaplásico, pero no se incluyeron muestras de CMT.

En el primer estudio realizado en esta tesis se investigó la familia de proteínas NF- κ B y los genes diana BcL-xL, FLIP y ciclina D1, en el CMT.

1.4 APOPTOSIS

1.4.1 Generalidades

La apoptosis es un complejo mecanismo de muerte celular, que está controlada por una serie de genes que la inducen. El término apoptosis fue introducido por Kerr en 1972. Puede ser fisiológica o patológica. Morfológicamente las células apoptóticas muestran una condensación de la cromatina y del citoplasma, que acabará en una fragmentación nuclear y citoplasmática, formando los cuerpos apoptóticos (Kerr, 2002). Los cambios morfológicos descritos se deben a la activación de un grupo de proteasas denominadas caspasas. La cascada de las caspasas pone en marcha los mecanismos moleculares responsables de la degradación proteica y genética que ocurren en las fases avanzadas de la apoptosis.

La apoptosis puede iniciarse de dos formas distintas, como respuesta a la activación de la vía extrínseca y/o como respuesta a los cambios de la vía intrínseca. La vía extrínseca se asocia a la activación de los receptores de muerte, como FAS, que provocan la activación de las caspasas 8, 9 o 10 (Salvesen and Dixit, 1997 ;Choi et al., 2004), mientras que la vía intrínseca está relacionada con la salida del citocromo c de la mitocondria y la posterior activación de las caspasas 3 y 9 (Geske and Gerschenson, 2001)

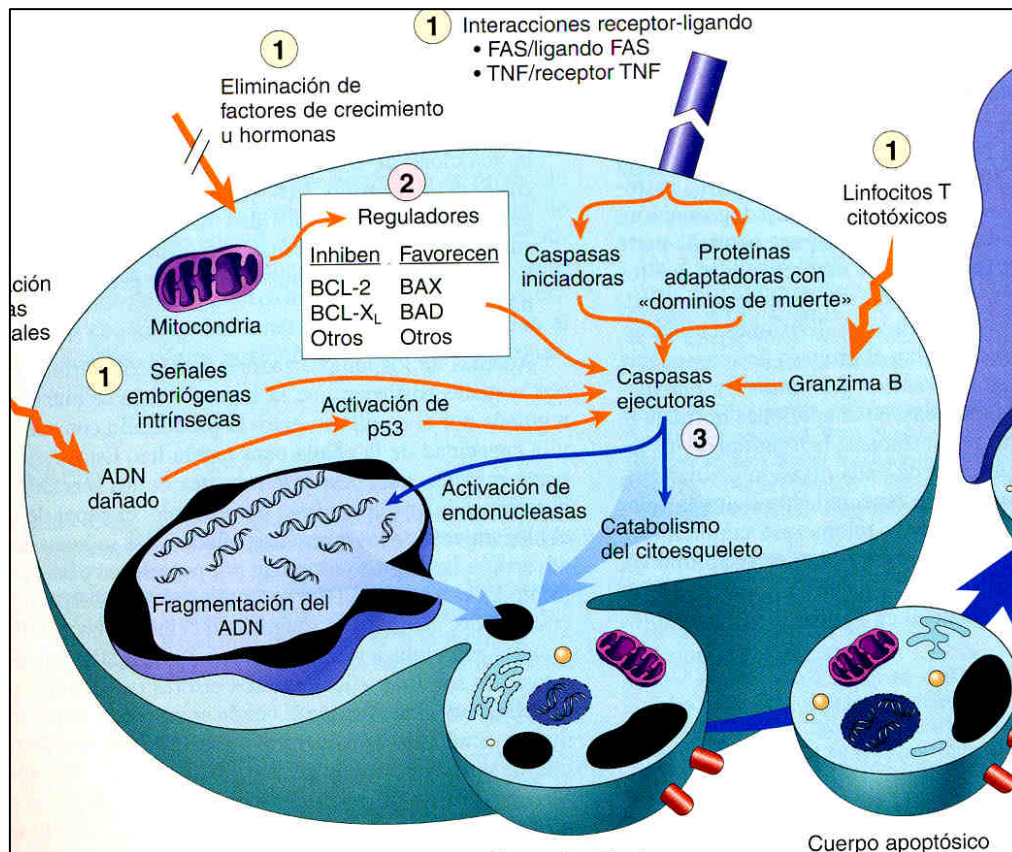


Fig 9 Esquema de los mecanismos de la apoptosis. Las dos vías de la apoptosis se distinguen en su inducción y regulación, y ambas culminan en la activación de las caspasas “ejecutoras”. Modificado del libro titulado Patología Estructural y Funcional, de Cotran, Kumar Robbins. 7ª edición.

1.4.2 Familia de las caspasas

Las caspasas son una familia de cisteína-proteasas que constituyen los principales efectores de la apoptosis y su activación es un indicador de muerte celular apoptótica. En los mamíferos se han descrito 14 caspasas diferentes, 11 de ellas se han observado en los humanos. Se pueden clasificar en tres grupos según su función: inflamatorias, iniciadoras de la apoptosis y ejecutoras de la apoptosis.

Las caspasas iniciadoras de la apoptosis son 4 y pueden dividirse en dos subgrupos: las caspasas 8 y 10 que contienen un dominio efector de muerte DED (de Death Effector Domain) y las caspasas 2 y 9 que contienen un dominio de reclutamiento de caspasas CARD (de Caspase-Recruitment Domain). Las

caspasas ejecutoras de la apoptosis son tres: la caspasa 3, la caspasa 6 y la caspasa 7. Se activan por medio de las caspasas iniciadoras. Como resultado de su activación se forma un complejo heterotetramérico compuesto por dos unidades cortas y dos largas (Wolf and Green, 1999). Su activación provoca la degradación de múltiples sustratos celulares (Degterev et al., 2003). Múltiples evidencias indican que la caspasa 3 ejerce el papel principal en la activación de las caspasas ejecutoras, mientras que el resto del grupo parecen tener un papel redundante en las diferentes vías apoptóticas (Zeng et al., 2000)

El efecto apoptótico mediado por la activación de todas estas caspasas puede ser bloqueado por medio de varias proteínas, entre las que se encuentran la familia de las IAPs. Inhiben la apoptosis mediante su unión directa a determinadas caspasas (Zeng et al., 2000) y su expresión se encuentra bajo el control de varias vías de señalización.

1.4.3 Vía extrínseca de la apoptosis

La vía extrínseca se inicia por la activación de receptores de muerte de la familia del TNF que están ubicados en la membrana plasmática. Entre estos receptores de muerte están: APO1/FAS/CD95, TRAILR1 y TNFR1. Todos estos receptores contienen un dominio intracelular conocido como dominio de muerte. Su activación se inicia a través de la unión de los ligandos específicos para cada receptor: FasL se une y activa el receptor FAS, TNF α activa a TNFR1 y TRAIL activa a TRAILR1. La unión del ligando al receptor activa una serie de proteínas adaptadoras que forman un complejo de señalización inductor de muerte denominado DISC (de Death Inducing Signalling Complex). Tras la formación de este complejo, se unen varias moléculas de procaspasa 8, que pasan a caspasa 8 (Salvesen and Dixit, 1997) y activan directamente otros miembros ejecutores de la familia como caspasa 3 y una cascada de proteólisis de varias proteínas. La diana final es el DNA que sufre fragmentación y la consiguiente muerte celular por apoptosis.

1.4.5 Vía intrínseca de la apoptosis

Las mitocondrias son organelas trascendentales en la apoptosis. La vía intrínseca se relaciona con la salida del citocromo c de la mitocondria y la activación de las caspasas 3 y 9. El inicio del proceso apoptótico depende fundamentalmente del balance de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Walensky, 2006). Las proteínas de esta familia juegan un papel fundamental en la regulación de la integridad mitocondrial y la respuesta a las diferentes señales apoptóticas (Li and Wang, 2006)

La familia Bcl-2 está formada por miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos. Las proteínas pro-apoptóticas son: Bax, Box y Bak, que muestran una estructura multidominio BH1, BH2 y BH3. Bax y Bak tienen una función redundante en la activación de la apoptosis (Lindsten et al., 2000). La proteína Bax se localiza predominantemente en el citosol de las células sanas y se transloca a la mitocondria cuando la célula recibe estímulos apoptóticos (Wei et al., 2001), mientras que Bak está localizada en la mitocondria de forma permanente (Griffiths et al., 1999). Ambas proteínas contienen una cadena hidrofóbica de aminoácidos que les permite insertarse en la membrana mitocondrial externa y en el retículo endoplasmático. Las señales de apoptosis inducen un cambio en la conformación de Bax que causa su translocación del retículo endoplasmático a la mitocrondria y su oligomerización promoviendo la liberación del citocromo c.

El otro grupo de proteínas pro-apoptóticas solo tienen el dominio BH3 y esta formado por: Bim, Bid, Bad, Bmf, Nix, Spike, Bnip3, Blk Noxa, Puma y Hrk/DP5. Estas proteínas requieren la ayuda de Bax o de Bak para inducir la disfunción mitocondrial (Wei et al., 2001). En ausencia de estímulos apoptóticos están unidas a las proteínas anti-apoptóticas. La regulación de las proteínas BH3, a nivel transcripcional, permite un control preciso de la apoptosis. Se ha demostrado la implicación de distintas vías de señalización y factores de transcripción en algunas de ellas como Bim, Noxa y Puma (Putcha et al., 2001), en concreto las vías: JNK, ERK/MAPK y PI3-K/Akt (Putcha et al., 2001; Weston et al., 2003), y los factores de transcripción Foxo3a (Sunters et

al., 2003) y NF- κ B (Inta et al., 2006) participan en el control de la expresión de Bim. Asimismo, las proteínas Noxa y Puma están bajo control post-transcripcional. Hay evidencias de que p53 y NF- κ B son los posibles reguladores de su expresión (Inta et al., 2006; Oda et al., 2000)

El grupo de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 contiene los 4 dominios de homología Bcl-2, en su estructura, llamados BH1, BH2 y BH3 y BH4. Sus miembros más conocidos son Bcl-2 y Bcl-xL. Estas proteínas tienen un papel importante en la inhibición de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Bcl-2 y Bcl-xL muestran una gran homología entre ellas (Kim, 2005). En condiciones fisiológicas, se encuentran en la membrana mitocondrial y en el retículo endoplasmático bloqueando la apoptosis mediante la formación de complejos con los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax y Bak.

1.4.6 Relación de NF- κ B con la regulación de la apoptosis

En general se acepta que la activación de NF- κ B es responsable de la resistencia a la apoptosis. NF- κ B puede activar la transcripción de varios genes involucrados en la supresión de la apoptosis, tanto por la vía mitocondrial como por medio del bloqueo de receptores de muerte. NF- κ B puede provocar una mayor expresión de proteínas bloqueadoras como FLIP (de FLICE- Like Inhibitory Protein). FLIP muestra alta homología con la caspasa-8 pero le falta actividad proteasa y compite con esta para unirse a DISC. Por eso los altos niveles de FLIP impiden la unión entre caspasa 8 y DISC, como se ha observado en muchos tumores (Dolcet et al., 2005^a; Dolcet et al., 2005^b) Se cree que estos altos niveles de FLIP explicaría la resistencia a factores de muerte en algunos tumores.

Otras proteínas de la cascada de señales de TNF- α tales como TRAF2 y TRAF6 también son dianas de NF κ B. Estas dos proteínas pueden dar lugar a la activación de señales de supervivencia mediadas por TNF.

Previamente se ha mencionado que la vía de señales PI3K/Akt es uno de los posibles responsables de la activación de NF- κ B y que uno de sus reguladores negativos es el gen supresor tumoral PTEN. Las alteraciones en este gen pueden activar de forma aberrante PI3K/Akt y subsecuentemente NF- κ B. Por otro lado se ha publicado que NF- κ B puede regular la pérdida de función de PTEN. Por eso la disminución en la expresión de PTEN puede aumentar la actividad de Akt y suprimir la apoptosis (Dolcet et al., 2005^a).

Como se ha mencionado previamente, NF κ B induce la expresión de IAPs y algunos miembros de la familia de genes anti-apoptóticos Bcl-2. Los inhibidores c-IAP1, c-IAP2 y XIAP suprimen la apoptosis tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca mediante el bloqueo de las caspasas, en las células de los mamíferos (Deveraux et al., 1999).

NF- κ B puede interferir con la actividad transcripcional de p53, ya que inhibe la apoptosis inducida por esta proteína de dos formas: a través de la ganancia de función de genes antiapoptóticas y por medio de la disminución de la función de p53 (Dolcet et al., 2005^a). Sin embargo hay algunas evidencias que apoyan el papel proapoptótico de ciertos dímeros de NF- κ B. Se ha especulado que NF- κ B puede ejercer una función dual, ya sea como inhibidor o como activador de la muerte celular apoptótica, según los niveles de p65 y de c-rel.

La relación de NF- κ B con algunos genes diana relacionados con la apoptosis y la supervivencia celular, ya mencionados, se puede visualizar en el siguiente esquema (Fig 10).

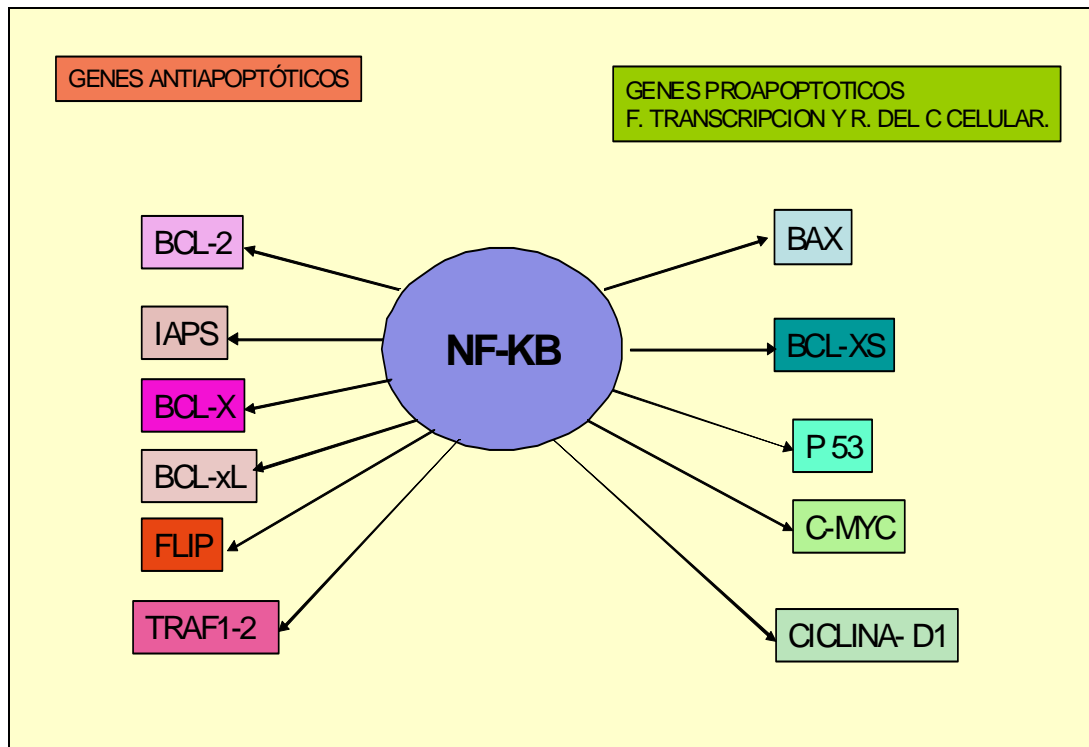


Fig.10: Esquema de los principales genes proapoptóticos y antiapoptóticos relacionados con NF-kB.

Hemos investigado la relación de NF-kB con tres genes diana BCL-xL, Ciclina D1 y FLIP, en el CMT, ya que este tumor es agresivo, pero muestra escasas figuras de mitosis y bajo índice de proliferación, por lo que es posible, que estén alterados algunos de los mecanismos de la apoptosis.

1.5 SPROUTY

Como se ha mencionado previamente, la señal incontrolada del receptor RET provoca, entre otras lesiones, el desarrollo del CMT. La mitad de los carcinomas medulares esporádicos no presentan mutación de RET (Boikos and Stratakis, 2008). Por otro lado, se ha demostrado una relación antagónica entre RET y algunas proteínas de la familia Sprouty (Spry). Spry-2 bloquea las señales de RET mediadas por GDNF/RET en líneas celulares de neuroblastoma (Ishida et al., 2007) y antagoniza la señalización de RET en el sistema nervioso entérico (Taketomi et al., 2005). Además, Spry1 bloquea la señalización por GDNF durante la organogénesis renal en ratón (Basson et al., 2005; Basson et al., 2006)

1.5.1 Familia de proteínas sprouty

La primera proteína de la familia Sprouty se identificó al investigar el desarrollo de las vías aéreas en *Drosophila melanogaster* (dSpry). Esta proteína pesa 63 kDa y contiene un dominio único de 124 residuos aminoacídicos ricos en cisteínas (CRD de Cistein-Rich Domain)(Hacohen et al., 1998). Se han identificado homólogos de dSpry en otros animales como el ratón, la gallina, la rana *Xaenopus laevis*, y en los humanos. Los genes Spry muestran una similitud de secuencia prácticamente restringida al CRD de la porción C-terminal (Hacohen et al., 1998). Tanto en ratón como en humanos se han identificado 4 genes homólogos de Spry (Spry1-Spry4) que codifican cuatro proteínas, de un tamaño menor (32-35 kDa) respecto a dSpry, y que muestran divergencia de secuencia en su mitad N-terminal, excepto a nivel de una pequeña secuencia altamente conservada que contiene un residuo tirosina –Tyr55 en hSpry2 (Fig.11). Dicha tirosina puede ser fosforilada y posteriormente reconocida por dominios de tipo SH2, presentes en varias moléculas de señalización intracelular. La variabilidad de secuencia de la región N-terminal en los cuatro homólogos de mamíferos podría indicar diferentes funciones para cada miembro como son: control de su localización,

estabilidad, asociación y destrucción, mediante la formación de distintas interacciones proteína-proteína.

Últimamente se han publicado varios trabajos que muestran la importancia de una región rica en serinas (SRD) , también altamente conservada entre los distintos miembros de la familia de Sprouty, y que se localiza adyacente al CRD, alrededor de los residuos situados en posiciones 120 a 140 de Sprouty2 (Aranda et al., 2008; Lao et al., 2007). Estos trabajos sugieren que algunos residuos de Ser y/o Thr de este dominio se encontrarían fosforilados en condiciones basales, y que su desfosforilación sería un requisito para la activación de esta proteína.

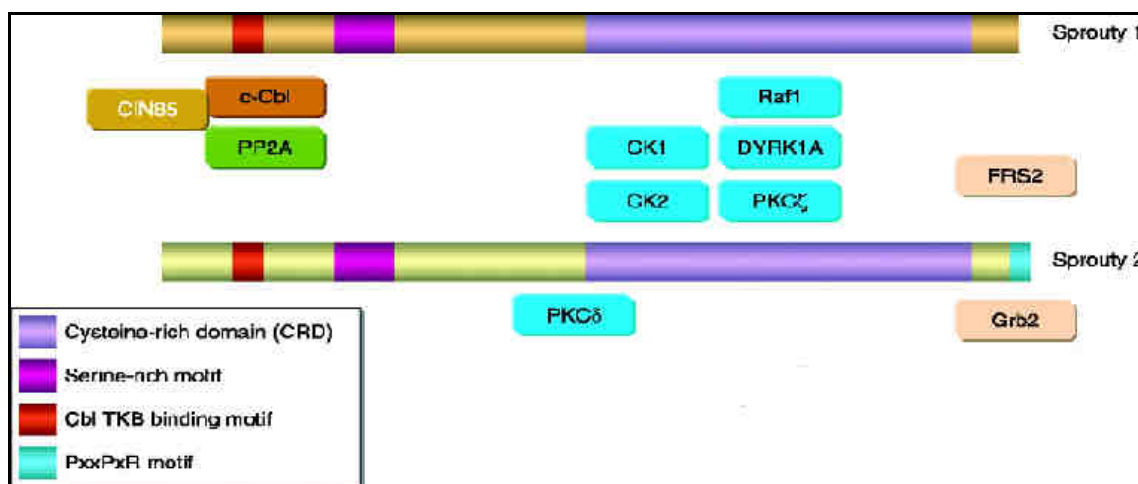


Fig. 11: Esquema de la organización estructural de 2 proteínas de la familia Sprouty. Dominios que caracterizan a las proteínas Spry en las isoformas 1 y 2.

(modificado de Lao et al., 2007)

1.5.2 Mecanismos de acción de Sprouty

Todavía no se ha confirmado un mecanismo de acción global de estas proteínas. Los estudios iniciales sobre dSpry establecieron que ésta actuaba como un inhibidor general de la señalización de RAS mediada por RTKs (Hacohen et al., 1998). Las proteínas Sprouty inhiben de forma específica la

señalización de la vía RAS/RAF/MAPK inducida por RTK, sin afectar otros mecanismos de señalización (Gross et al., 2001; Yusoff et al., 2002). Existe controversia respecto al punto en el cuál Sprouty bloquea la activación de la cascada ERK/MAPK, puesto que las evidencias experimentales sugieren la existencia de múltiples mecanismos que dependen del contexto celular y/o del tipo de RTK que se trate. Se ha publicado que las proteínas Sprouty interaccionan con varios componentes de las vías de transducción mediadas por RTK, pero en la mayoría de casos, aún no queda claro cómo dichas interacciones modulan la señalización.

Los siguientes estudios muestran la variabilidad de sus interacciones. Durante el desarrollo de los ojos en *D. melanogaster*, dSpry inhibe la señalización inducida por EGFR en un punto previo a la activación de Ras (Hacohen et al., 1998), mientras que en el desarrollo de las alas y del ovario, dSpry actúa a nivel de RAF-es decir posterior a RAS- (Reich et al., 1999). En fibroblastos de ratón, Sprouty2(mSpry2) actúa tras la activación del Receptor para el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFR), previo a la activación de RAS (Gross et al., 2001), mientras que en células 293T, bloquea la señalización tanto de FGFR como del Receptor α_2 Adrenérgico, a nivel de RAF (Yusoff et al., 2002). Por otro lado, mSpry4 interfiere con la activación de RAF independiente de RAS mediada por el Receptor para el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGFR) (Sasaki et al., 2003).

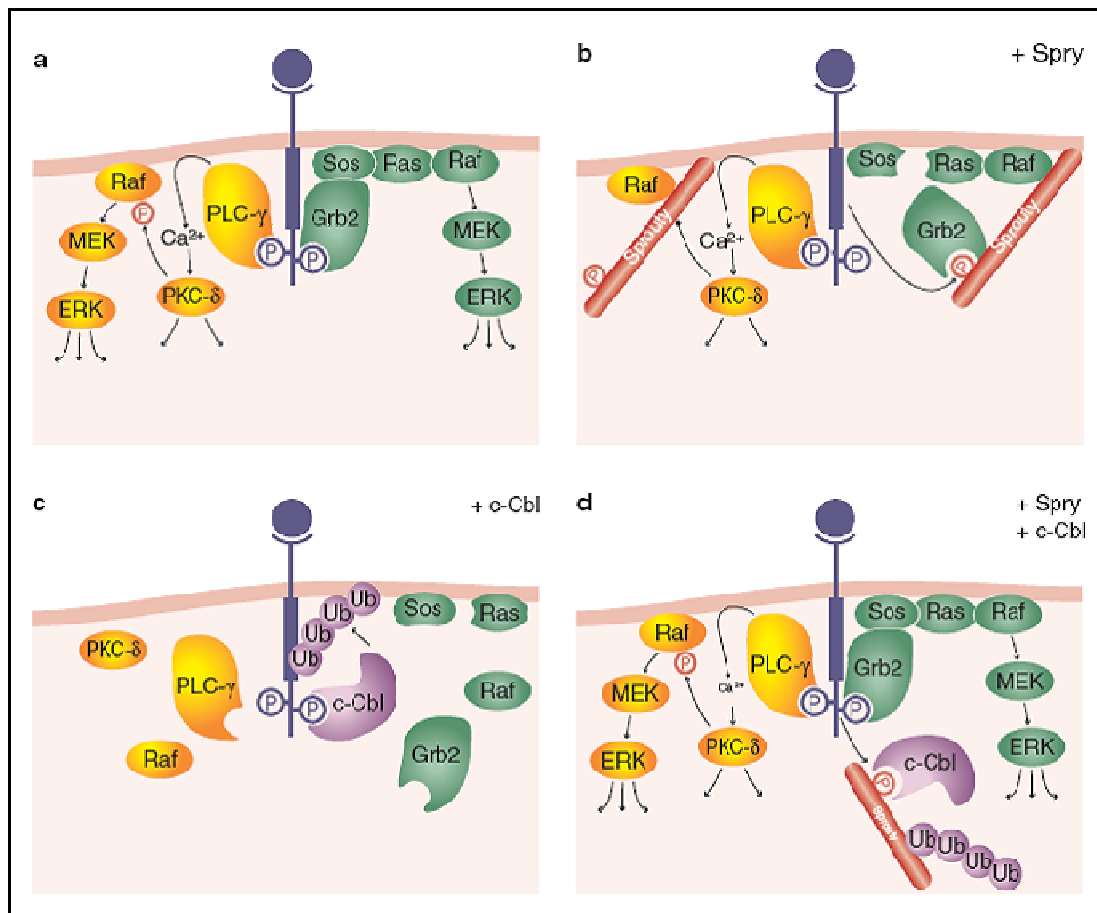


Fig. 11. Modelo de los diferentes mecanismos de acción propuestos para Sprouty.

Esquema general de la activación de las vías de señalización RAS-RAF/ ERK/ MAPK (en verde) y PLCγ-/PKCδ (en anaranjado) por RTKs. A) En ausencia de Spry y c-Cbl, la señalización ocurre a través de ambos mecanismos. Obsérvese que la activación de PKCδ provoca la señalización hacia la vía RAF/ ERK/ MAPK independiente de Ras. B) En presencia de c-Cbl, esta se une a las tirosinas fosforiladas del RTK activado, resultado en su ubiquitinización, endocitosis y degradación final. Por lo tanto la señalización disminuye. C) En presencia de Spry, la proteína es fosforilada en residuos tirosina, que funcionan como sitios de acoplamiento para los dominios SH2 y PTB, presentes en diversas moléculas adaptadoras/efectoras. Así, la unión competitiva de Spry a Grb2, SOS o Ras tiene como resultado la inhibición de la vía RAS-RAF/ ERK/ MAPK. Por medio de su RBD, Spry puede actuar directamente con RAF e impedir así la activación de la vía PLCγ-/ PKCδ / RAF MAPK, independiente de RAS. D) Modelo propuesto para la activación de EGFR por Spry. En presencia de c-Cbl y Spry, la fosforilación de este, reclutaría a c-Cbl con gran afinidad, evitando la ubiquitinación del RTK y prolongando su actividad de señalización. RTKs(Christofori, 2003).

Otro grupo determinó que Sprouty 4 humano (hSpry4) reprime la señalización mediada por los Receptores de Insulina y de EGF en un punto previo o a nivel de RAS (Leeksma et al., 2002). Estos resultados confirman los de un estudio en células endoteliales de ratón en las que mSpry4 inhibía la función del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y VEGF a través del desacoplamiento de la activación de RAS (Lee et al., 2001). En otros estudios sobre Spry1 de *X. laevis* (xSpry1) y mSpry2 sugieren que Sprouty antagoniza la activación de la vía ERK/MAPK inducida por FGF en base a su capacidad para competir con Shp2 y FRS2 por la unión con el complejo Grb2-SOS. Según este modelo, la interacción Spry-Grb2 está mediada por la unión del dominio SH2 de Grb2, al residuo fosfo-Tyr55 de Sprouty2. Sin embargo, otros grupos observaron que la unión de Spry2 al complejo Grb2-SOS era constitutiva y que no inhibía la unión de FRS2 (Gross et al., 2001).

Spry1 también es un potente inhibidor de la señalización de RTKs. Se acepta que cuando se activa la cascada de señalización RAS/ERK/MAPK, la proteína ERK fosforilada entra en el núcleo y activa la transcripción de varios genes diana entre ellos Sprouty. La proteína Sprouty resultante se fosforila en su residuo tirosina y es capaz de parar la activación de la cascada RAS/ERK/MAPK inhibiendo la activación de RAS o RAF (Masson et al., 2006).

En su conjunto, las evidencias actuales sugieren que la fosforilación de Sprouty permite a sus monómeros y/u oligómeros reclutar a aquellos cofactores requeridos para mediar sus efectos represivos. Queda sin determinar si la fosforilación en tirosinas de Sprouty es siempre necesaria para la inhibición de la señalización de RTKs (Hanafusa et al., 2002; Impagnatiello et al., 2001).

Existen numerosos datos de que en ciertos contextos celulares Sprouty puede inhibir la activación de la cascada RAF/ERK/MAPK inducida por VEGF, en una posición inferior a RAS e interfiere la formación de un complejo entre Spry4 y RAF-1, a través de un motivo de la región C-terminal de Sprouty4 y, por eso, sin requerir fosforilación de su tirosina N-terminal (Sasaki et al., 2003). En conclusión parece que Sprouty actúa a través de dos mecanismos simultáneamente, uno de ellos, que es controlado de forma rápida y reversible

por medio de la fosforilación del residuo tirosina conservado y otro, que depende de la regulación transcripcional y de la expresión de sus genes en respuesta a los factores de crecimiento.

La expresión de Sprouty es clave en la morfogénesis de varios órganos importantes, fundamentalmente en la angiogénesis y ramificación, de los pulmones y de los riñones. Basson y sus colaboradores, determinaron que ratones *Spry1*null recién nacidos (por delección selectiva del gen) presentan defectos en el riñón y en el tracto genito-urinario que se asemejan al síndrome humano CAKUT (de Congenital Anomalies of the Kidney and the Urinary Tract) (Ichikawa et al., 2002). Este fenotipo se debe a alteraciones de la yema uretérica (UB, de Ureteric Bund) durante la morfogénesis. En el ratón mutante para *Spry1*, la UB inducida por GDNF, es más ancha, y con frecuencia múltiple, apareciendo desde distintas posiciones del Conducto de Wolff (WD) (Vainio and Lin, 2002). En estos ratones, las células del WD se vuelven hipersensibles a GDNF, de manera que el dominio de señalización de GDNF se extiende anteriormente a lo largo del WD. Este fenotipo es revertido cuando, simultáneamente, se elimina la expresión de un alelo del gen GDNF.

Varios estudios, realizados en un modelo “in vitro”, confirman el efecto inhibitorio que Sprouty ejerce sobre la actividad del sistema GDNF/RET (Ishida et al., 2007). En dicho trabajo observaron que, en líneas celulares de neuroblastoma, *Spry2* regula la proliferación y la diferenciación dependientes de GDNF/RET. Taketomi y su grupo estudiaron otro modelo de ratones knock-out para *Spry2* (*Spry2*KO) simultáneamente (Taketomi et al., 2005). En ellos se determinó que exhibían un fenotipo gastro-intestinal caracterizado por defectos en las contracciones del esófago e intestino, asociados a una hiperplasia del sistema nervioso entérico. Las neuronas entéricas de estos animales presentaban una actividad incrementada de las vías de señalización ERK/MAPK y PI3K/AKT en respuesta a GDNF, sugiriendo que el fenotipo mencionado podría deberse a un fenómeno de hipersensibilidad a dicho factor.

Todos estos datos demuestran la relevancia de las funciones que estas proteínas desempeñan en la regulación de la señalización por RET durante el

desarrollo, y apoyan la hipótesis, según la cual, Sprouty restringe el nivel de las señales inducidas por los GFLs que perciben las células.

1.5.3 Sprouty y cáncer

Dado que Sprouty se considera un regulador negativo de la señalización de RTKs mediada por factores de crecimiento, varios grupos han comenzado a investigar el papel de estas proteínas en cánceres humanos. Se ha observado relación con diversos tipos de tumores como son el carcinoma hepatocelular, linfoma B, neuroblastoma (Fong et al., 2006; Frank et al., 2009; Ishida et al., 2007; Kwabi-Addo et al., 2004) , carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Sutterluty et al., 2007) y de endometrio (Velasco et al., 2011).

Se ha determinado que la expresión de Spry1 y Spry2 está significativamente disminuida en cáncer de mama (79% y 96% respectivamente) y de próstata (40% para Spry1), así como también en líneas celulares de melanoma (Kwabi-Addo et al., 2004; Lo et al., 2004; McKie et al., 2005; Tsavachidou et al., 2004)

Los mecanismos por los cuales Sprouty se encuentra regulado a la baja son variables y pueden ser específicos para cada tipo de cáncer. En un 82% de casos de cáncer de próstata se ha detectado hipermetilación del promotor de Spry2 (McKie et al., 2005). Asimismo, entre 27-40% de los casos presentaba pérdida de heterozigosidad (pérdida de un alelo) en este gen, exhibiendo el alelo restante metilado. La inducción de Spry1 en respuesta a FGF en líneas celulares de cáncer de próstata es muy débil (Kwabi-Addo et al., 2004). Por otro lado, en cáncer de mama Spry2 se encuentra silenciado, pero dicha represión no parece deberse a un proceso de hipermetilación de su promotor, sino posiblemente a la expresión anómala de algún factor de transcripción requerido para su expresión (Lo et al., 2004).

En melanoma, donde la vía ERK/MAPK está sobreactivada, el mecanismo de estos tumores para escapar de la regulación por medio de Sprouty es doble (Tsavachidou et al., 2004). Por un lado están los melanomas en los que B-RAF

tiene mutaciones activadoras, y como consecuencia de las mismas, Spry2 pierde la capacidad de unírsele y reprimir su actividad. Por otro lado existen melanomas en los que B-RAF no está mutado, pero la expresión de Spry2 está disminuida, debido a un mecanismo aún desconocido.

La pérdida en la expresión de Sprouty parece ser un suceso tardío en la progresión del cáncer. Así, cánceres de próstata en estadios tempranos mantienen la expresión normal de Spry2, sin embargo los cánceres metastáticos muestran la expresión de Spry2 disminuida (McKie et al., 2005). Basándose en este dato, se ha apuntado la posibilidad de utilizar el nivel de expresión de Sprouty como un marcador de progresión de la enfermedad.

1.5.4 Sprouty y cáncer de tiroides

La señal incontrolada del receptor tirosinquinasa RET provoca, entre otras lesiones, el desarrollo del CMT, pero la mitad de los carcinomas medulares esporádicos no presentan mutación de RET (Boikos and Stratakis, 2008). Además se ha demostrado relación antagónica entre RET y algunas proteínas de la familia Sprouty, ya mencionado en el párrafo anterior.

Varios estudios han encontrado algunas alteraciones moleculares en los genes de la familia Sprouty en el CMT. Un 27% de los tumores mostraron pérdidas alélicas en 4q28.1 en los mapas génicos Spry1, y en el 33% de los casos, pérdidas genómicas en 5q31.1, en el gen Spry 4 (Ye et al., 2008).

Algunos aspectos de esta función no son conocidos y deben ser determinados. Es posible que algunos de los CMT esporádicos sin la mutación de RET, se originen por alteraciones moleculares en otros genes, entre los que destaca la familia Sprouty. En la 2ª parte de esta tesis hemos estudiado la relación entre Spry1 y la HCC, lesión precursora del CMT.

1.6 PARAGANGLIOMAS TIROIDEOS.

Los paragangliomas tiroideos (PT) son tumores extraordinariamente raros que pueden confundirse con otras neoplasias de la glándula tiroides.

1.6.1 Aspectos generales

Los paragangliomas (PGL) son neoplasias neuroendocrinas que derivan de las células de la cresta neural (de los paraganglios) y pueden hallarse en la glándula tiroides de forma excepcional. Los paragangliomas extra-adrenales pueden ser tumores del sistema nervioso simpático o parasimpático. Los PGL originados en la región de la cabeza, el cuello, y en el mediastino medio, están estrechamente alineados con el sistema nervioso parasimpático y algunos de ellos tienen relación con los arcos branquiales (Yano et al., 2007). Con raras excepciones, no dan \square aragang endocrinos.

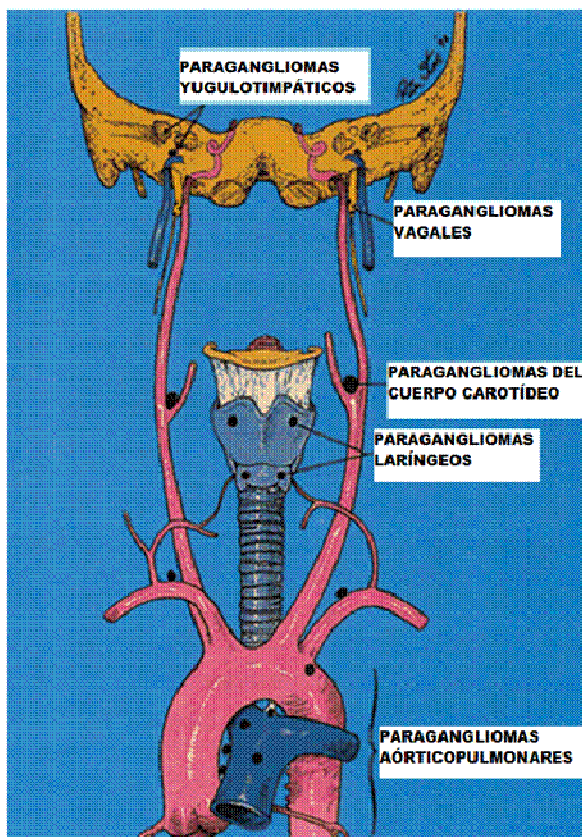


Fig 11: Esquema de la distribución de los PGL en la cabeza, cuello y mediastino. Modificado de Rao et al. From the archives of the AFIP. Paragangliomas of the head and neck: radiologic-pathologic correlation. Armed Forces Institute of Pathology. Radiographics. 19 (6): 1605-32

Los PGL pueden ocurrir esporádicamente o formar parte de diferentes síndromes de tumores hereditarios, como los síndromes de paraganglioma/feocromocitoma (PGL/PCCS) o del complejo succinato deshidrogenasa (SDH). Estos síndromes se han clasificado genéticamente en 4 entidades (PGL1, PGL2, PGL3 y PGL4) asociadas a mutaciones en la línea germinal, de los genes de SDHD, SDHAF2, SDHC y SDHB respectivamente. Los genes SDH codifican las subunidades succinato deshidrogenasa, una enzima con una función clave en el ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria (Eng et al., 2003). La entidad más interesante para nuestro estudio es PGL1, que se manifiesta comúnmente con quiste de cabeza y cuello (Boedeker et al., 2013), y se hereda por línea paterna (Muller, 2011). PGL2 es una causa bastante rara de PGL de cabeza y cuello sin otros tumores acompañantes y no se acompaña de metástasis (Burnichon et al., 2010; Douwes Dekker et al., 2003). PGL3 es también un síndrome muy poco frecuente, caracterizado por paragangliomas unifocales benignos y generalmente localizados en el cuerpo carotideo. Los pacientes muestran un alto riesgo de tumores del estroma gastrointestinal (Pasini et al., 2008). PGL4 se manifiesta como PGL simpático intraabdominal y se caracteriza por un alto riesgo de malignidad. Casi nunca se observa PGL de cabeza y cuello (van Nederveen et al., 2009) No se han publicado casos asociados a neoplasia endocrina múltiple.

Los paragangliomas pueden hallarse en sitios muy poco frecuentes como la órbita, senos paranasales y la glándula parótida (LaGuette et al., 1997). Una de las localizaciones menos frecuentes es la glándula tiroides, donde normalmente no hay paraganglios. Se han descrito menos de 40 casos. En esta localización se cree que son, probablemente, un subgrupo de los paragangliomas laringeos. Los PT son muy poco frecuentes, constituyen el 0,6% de los tumores en esa localización, y su diagnóstico puede causar algunos errores. Muy pocos PT han sido diagnosticados antes de la resección quirúrgica (Schmit et al., 2006; Phitayakorn et al., 2011).

1.6.2 Clínica

Los PT son mas frecuentes en mujeres que en hombres (8/1). La edad de presentación es amplia (9-73 años) aparece como un nódulo o masa intra-tiroidea de tamaño variable (1-10 cm). Se ha descrito un solo caso en tiroides cervicotorácico (Zakkar and Hunt, 2013). Un 14% de los casos se asocian a otros síntomas¹deos (Phitayakorn et al., 2011), generalmente en el cuerpo carotídeo (Hughes et al., 1997), o en el glomus vagal (Schmit et al., 2006). Un caso de PT se presentó asociado a dos tumores en la region tiroidea: un carcinoma papilar de tiroides y a un adenoma paratifoideo (Cayot et al., 1982).

La mayoría de los tumores son asintomáticos, pero se han descrito con²íntomas clínicos como disfagia, estridor, dificultad para respirar, parálisis de cuerda vocal, hemoptisis y ronquera. Estos síntomas se han observado, generalmente, en los casos de invasión local que son más frecuentes en los pocos varones afectados (Armstrong et al., 2012). La ecografía y la TAC muestran un nódulo solitario, sólido, hipoecogénico y muy vascularizado.

1.6.3 Aspecto macroscópico

Los PT se presentan como másas sólidas, encapsuladas o no, de color marrón-rojizo. Pueden presentar hemorragia, invadir la cápsula del tiroides e infiltrar localmente estructuras de partes blandas, traquea, laringe y esófago.

1.6.4 Características microscópicas

Los PT están rodeados de una cápsula que puede ser gruesa, con tractos fibrosos dentro de los lóbulos. Las células tumorales pueden formar un patrón de nidos (Zellballen). Otras áreas muestran cordones anastomosados y ordenados en láminas. Puede presentar artefacto de retracción. Algunas áreas muestran hialinización perivascular prominente. Se observan folículos

atrapados en la periferia del tumor. Solo 1 caso ha mostrado marcada esclerosis estromal que puede sugerir malignidad (Evankovich et al., 2012) .

Las células tumorales son de tamaño mediano o pequeño con moderada cantidad de citoplasma granular anfófilo, pero puede ser vacuolado. El núcleo es generalmente redondo u oval, a veces excéntrico, con cromatina fina y nucleolo pequeño. Entremezcladas con las células descritas, se observan otras más pequeñas de aspecto elongado. Muestran el citoplasma densamente eosinófilo y el núcleo picnótico y triangular. Puede observarse la presencia de algunas células pleomórficas y de aspecto bizarro. Pueden verse ocasionales células degeneradas. Las mitosis son muy escasas (0%-7%). No se constata invasión perineural ni depósito de amiloide.

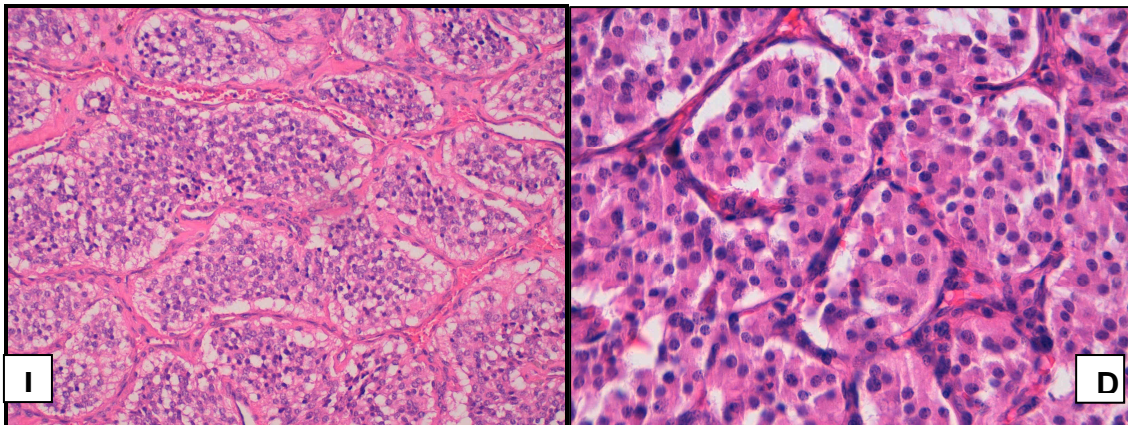


Fig.12: Imágenes microscópicas de PT. Izda: nidos celulares rodeados de septos fibrovasculares (uno de los PT de la serie). Dcha: Detalle de las células tumorales de moderado citoplasma anfófilo y núcleo redondo u oval, (otro de los PT de la serie).

El PT puede simular microscópicamente un CMT de patrón paragangliomatoso, un adenoma trabecular hialinizante, un adenoma folicular atípico, un tumor de células de Hürtle y un tumor carcinoide metastático, sobre todo en el estudio preoperatorio. En raras ocasiones, parece un hemangiopericitoma o un glomangioma.

Los hallazgos citológicos del material obtenido por punción-aspiración con aguja fina no son concluyentes (Ashraf et al., 2008) especialmente si el tumor presenta atipia celular. Pueden observarse células aisladas o en nidos poco cohesivos de células redondas u ovales que contienen núcleos ovales. El material simula una neoplasia folicular (Yano et al., 2007) o un carcinoma medular (Armstrong et al., 2012).

1.6.5 Inmunohistoquímica

En general, los paragangliomas extra-adrenales son positivos para los marcadores neuroendocrinos genéricos como cromogranina A y sinaptofisina. Las células subtentaculares son S-100 positivas. Estas células fusiformes han presentado una tinción positiva para neurofilamentos, enolasa neuroespecífica y PGP 9.5.

Se ha descrito inmunoreactividad para citoqueratinas y para una serie de péptidos como son el polipéptido pancreático (PP), somatostatina, leu-enkeptalin, serotonina, glucagón, péptido intestinal vasoactivo (VIP) insulina y gastrina. Asimismo se ha detectado calcitonina en algún caso de PT (Ferri et al., 2009). El índice mitótico, medido con Ki-67/MIB-1 es típicamente bajo (Tischler and Komminoth, 2004).

1.6.6 Alteraciones moleculares

Se han publicado escasos estudios moleculares. No se han observado mutaciones ni polimorfismos en RET (Gonzalez Poggioli et al., 2009, Phitayakorn et al., 2011). En un trabajo reciente se describen alteraciones en 2 genes. Por un lado, se han observado 2 alteraciones en las secuencias del gen N-methyl transferasa (NNMT) en el locus PGL-1 caracterizado por un polimorfismo heterocigoto de un solo nucleótido y también una mutación homocigota extragénica. NNMT codifica una enzima que tiene un importante papel en la proliferación celular y en la resistencia a la quimioterapia. Por otra parte, se han descrito múltiples polimorfismos heterocigotos y homocigotos, en las subunidades B, C y D del gen SDH (Costinean et al., 2012).

El diagnóstico correcto de PT o de CMT tiene importantes implicaciones quirúrgicas y postoperatorias, por lo que se ha tratado de encontrar una batería de marcadores inmunohistoquímicos epiteliales, neurales y hormonales que sean preceptivos (obligatorios) para este diagnóstico diferencial.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Las alteraciones en diversos genes involucrados en CMT juegan un papel en la progresión tumoral y en el desarrollo de lesiones precursoras.

Los perfiles de expresión de los genes pueden mejorar el conocimiento de este tumor y facilitar la obtención de baterías inmunohistoquímicas importantes para el diagnóstico diferencial.

2.2 OBJETIVOS

1- Estudiar la expresión de miembros de la familia NF- κ B en CMT

- Valorar la expresión inmunohistoquímica de los miembros de la familia NF- κ B (p-50, p-65, p52, c-rel y Rel B) y sus posibles dianas (FLIP, BclxL y ciclina D1).
- Correlacionar la expresión de los miembros de la familia NF- κ B y sus posibles dianas con la presencia de mutaciones de RET.

2- Estudiar el papel de Spry1 en el desarrollo de hiperplasia de células C de la glándula tiroides.

.Estudiar las células C en ratones modificados genéticamente (delección selectiva) para Spry1 y compararlas con las de ratones normales.

3.- Diseño de baterías inmuno-histoquímicas para diagnóstico diferencial del CMT partiendo de su perfil de expresión.

.Diseño de baterías inmuno-histoquímicas de CMT, PGL de cabeza y cuello.

.Comprobar la fiabilidad de la batería inmunohistoquímica en los 4 ejemplos de PT.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En esta tesis se han realizado tres estudios separados, pero relacionados entre si. Tienen como elemento común el CMT y sus lesiones precursoras. En el primero hemos realizado un estudio de la familia NF-Kb y sus dianas mediante tinción inmunohistoquímica, en arrays de tejido (TMA, de Tissue-MicroArray) de CMT. En el segundo hemos evaluado las células C mediante tinción inmunohistoquímica de calcitonina, en las glándulas tiroides de 2 grupos de ratones, uno de ellos modificado genéticamente para Spry1. En el tercer trabajo, hemos estudiado 6 proteínas mediante inmunohistoquímica, comparando su expresión en dos TMA (CMT versus PLG), para mejorar el diagnóstico diferencial entre los dos tumores. Las mismas proteínas se testaron en 4 casos de PT.

3.1 MATERIAL

En el conjunto de los tres estudios hemos utilizado el material que se describe a continuación:

3.1.1 Tumores

3.1.1.1 Carcinomas medulares de tiroides

Los carcinomas medulares formaban parte de 2 grupos:

- a) Un grupo de 73 casos de CMT (70 tumores primarios y 3 metastásis) de pacientes, diagnosticados entre los años 1983 y 2001, en varios centros: Hospital de Santa Creu i Sant Pau de Barcelona y casos consulta del Dr. Matías-Guiu.
- b) Un grupo de 12 casos de metástasis de CMT adicionales, diagnosticados entre los años 1983 y 2007, procedentes de los archivos de anatomía patológica de varios centros: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de

Barcelona, Hospital Arnau de Vilanova de Lérida y casos consulta del Dr. Matías-Guiu.

3.1.1.2 Paragangliomas

Los paragangliomas estaban constituidos por dos tipos de muestras:

- a) Un grupo de 24 PGL de cabeza y cuello procedentes de los archivos de anatomía patológica integrados en la Red de Bancos de Tumores, coordinada por el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).
- b) Cuatro casos de PT procedentes de los archivos de anatomía patológica de los siguientes centros: Hospital Gregorio Marañón y Hospital de la Princesa de Madrid, Hospital de A Coruña y Hospital Arnau de Vilanova de Lérida.

3.1.2 Animales

Se utilizaron ratones procedentes del laboratorio del grupo de investigación del Dr. Mario Encinas del Instituto de Investigación Biomédica de Lleida (IRBLleida). Se cruzaron ratones de las cepas 129/Sv (marrones) con ratones BL6 (negros) hembras y machos *spry1* +/- . De las camadas resultantes, se seleccionaron los ratones homocigotos *Spry1* -/- y *Spry1* +/+ (también algunos ratones heterocigotos *Spry1* +/-). Los animales *Spry1* -/- muestran malformaciones renales y ureterales muy importantes y mueren antes de los 5 meses de vida.

3.2 MÉTODOS

Los estudios inmunohistoquímicos en los CMT y PGL se hicieron, principalmente, sobre TMA. El estudio en ratones se realizó en secciones completas de la glándula tiroides.

Construimos un total de tres TMA. Uno de 73CMTs (TMA nº1) para el estudio inmunohistoquímico de la familia NF-kB y, dos nuevos TMA, de 30 CMT (TMA nº2) y de 24 PGL (TMA nº3), para el estudio inmunohistoquímico comparativo de 6 proteínas entre los PGL y CMT.

Para elaborar los TMA seguimos los siguientes pasos:

3.2.1 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE LOS TMA

La mayor parte del procedimiento fue común en todos los casos. Las diferencias (número de cilindros del TMA y diámetro de los cilindros) se describen en el apartado correspondiente.

3.2.1.1 Selección de los casos

Se describe la selección de cada estudio por separado:

-Para la construcción del TMA nº1, seleccionamos los bloques de parafina de 73 casos de CMT en los que previamente se habían evaluado las mutaciones somáticas o germinales de RET en el Hospital de la Santa Creu y Sant Pau, entre los años 1983 y 2001. Veintinueve pacientes mostraban mutaciones de RET (Tabla III).

Exón	Mutación germinal	Mutación somática
10	2	0
11	11	1
13	0	0
14	0	0
15	0	0
16	0	15

Tabla III: Mutaciones de RET de los CMT del TMA nº1. Exón mutado y número de casos de nuestra serie.

-Para la construcción del TMA nº2, seleccionamos bloques de parafina de 30 casos de CMT (27 tumores primarios y 3 metastásis) entre los 73 casos utilizados para el primer estudio.

-Para la construcción del TMA nº 3, seleccionamos bloques de parafina de los 24 PGL, ya mencionados.

Tras la selección de los bloques donantes siguieron una serie de pasos comunes, para elegir las áreas representativas del tumor. Se describen a continuación:

- a) Se hizo un corte y se tiñó con hematoxilina eosina de todos los bloques seleccionados.
- b) Revisamos al microscopio óptico cada caso y elegimos varias áreas representativas del tumor (comprobando que en el bloque quedara más de 2mm de espesor) después marcamos con un rotulador, el punto exacto correspondiente a la zona elegida.
- c) Acoplamos cada preparación histológica al bloque de parafina correspondiente y marcamos las zonas elegidas en el bloque con un rotulador.

d) Construimos los distintos TMA según el procedimiento habitual, que se describe en varias secciones:

3.2.1.2 Procedimiento para la construcción de los TMA

El procedimiento se ha ordenado según se fue ejecutando. Se describen en conjunto las características comunes y por separado los escasos cambios realizados en los tres TMA.

3.2.1.2.1 Preparación del bloque receptor.

Preparamos tres bloques de parafina en blanco, de 40x25mm, para utilizar como receptor de las muestras tisulares, dos bloques para el TMA nº1 y uno para los TMA nº2 y nº3.

3.2.1.2.2 Diseño de los TMA

Confeccionamos plantillas de filas y columnas, una diferente para cada TMA, identificando todos los cilindros y su disposición.

El TMA nº1 de 73 CMT necesitó 2 plantillas. La primera estaba formada por los tumores de T1 a T38 y la segunda de los casos T39 a T76. Cada tumor se representó con 2 cilindros de 0,6mm de diámetro con espacio de 1mm entre los cilindros y además una muestra representativa de tiroides no tumoral de cada caso.

La plantilla del TMA nº2 se diseñó con 30 casos de CMT, 2 cilindros de 1mm de diámetro de cada caso. Además se incluyó una muestra representativa de tiroides no tumoral de cada caso.

La plantilla del TMA nº 3 se diseñó con 24 casos de PGL, 2 cilindros de 1mm de diámetro de cada caso, se dejó 1mm de espacio entre los cilindros. No se incluyó tejido normal.

En todas las plantillas se dejó un margen de 2,5-3mm, para evitar la fragmentación de la parafina. El grupo de muestras en cada TMA queda duplicado.

3.2.1.2.3 Construcción de los TMA

Tras reunir y preparar los elementos necesarios (bloques donantes, bloques receptores) se construyeron los TMA con la ayuda de un Tissue arrayer manual (Beecher Instrument, MD) de la siguiente forma:

- a) Se ajustó el bloque receptor en el portabloques, de modo que la superficie del bloque quede paralela a la placa base y no se mueva. El bloque de parafina receptor queda en una posición adecuada para introducir el cilindro de tejido.
- b) Se colocaron a cero los micrómetros que marcan la alineación de las filas y columnas de los cilindros.
- c) La aguja más gruesa de cada juego es la que hace el agujero en el bloque donante y la más pequeña hace el cilindro en el bloque receptor.
- d) Se efectuó el agujero correspondiente al bloque de parafina receptor, en primer lugar. Para ello se introdujo la aguja más pequeña y se empujó hasta llegar al tope. Se extrajo cada cilindro de parafina y se depositó en una cestilla. Se colocó una plataforma sobre el portabloques y, a continuación, el bloque de tejido donante sobre la misma.
- e) Se cambió la posición de las agujas y se extrajo el tejido del bloque donante. Se retiró la plataforma con el bloque donante. Se expulsó el cilindro de tejido

exactamente encima del agujero realizado en el bloque receptor, de forma que, quede justo a nivel de la parafina sin hundirlo. Se cambiaron las medidas del micrómetro, con el fin de hacer el siguiente agujero. Se repitió la misma operación con todos los cilindros hasta la finalización de cada TMA.

f) Una vez terminado el TMA, se aplicó una presión uniforme para empujar todos los cilindros a un mismo nivel y se dejó en una estufa a 37 °C durante 30 minutos. Esto permite que los cilindros del tejido se adhieran mejor a la parafina del bloque receptor. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de cortar.

3.2.1.2.4 Corte de los TMA

Se realizaron cortes de 3 micras de grosor. Cada laminilla se numeró con el mismo orden en el que fueron cortadas. Después se secaron a 56° C durante 16 horas. Cada laminilla se recubrió de parafina líquida, se dejó secar y se guardó hasta su utilización.

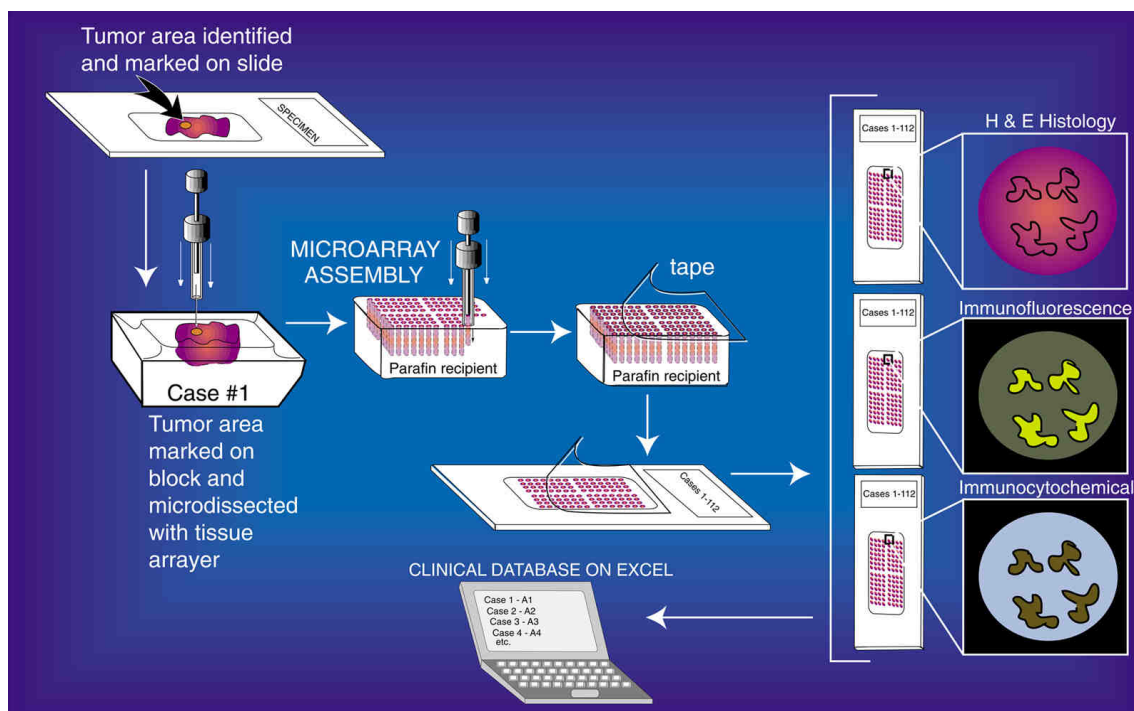


Fig. nº 13 Esquema representativo de los principales pasos en la construcción de un TMA. Procedente del curso "Tissue Microarrays at Johns Hopkins".

3.2.1.2 Preparación histológica del resto del material.

Para completar el estudio comparativo de seis proteínas entre CMT y PGL se realizaron cortes histológicos completos de 12 casos de metástasis de CMT adicionales y de los 4 PT.

Previamente los cuatro casos de PT se cortaron y se tiñeron con hematoxilina eosina comprobando que mostraban el típico aspecto de los paragangliomas parasimpáticos de cabeza y cuello.

3.2.2 PROCESAMIENTO DEL MATERIAL DEL ESTUDIO DE LAS CELULAS C EN GLÁNDULAS TIROIDES DE RATONES.

Se disecaron las glándulas tiroides de los 53 animales previamente seleccionados. Los ratones se sacrificaron en pequeños grupos. Se obtuvieron tiroides de 3 grupos representativos: el primer grupo correspondió a ratones recién nacidos (P0), el segundo, a ratones de 3 semanas (P3 semanas) y el tercero, a ratones de 13 semanas (P13 semanas). Se fijaron en formol, se incluyeron en parafina y se hicieron cortes completos y seriados de todo el material a 3 μ m. Se secaron en estufa a 65° C durante 1 hora. Cada laminilla se recubrió de parafina líquida, se dejó secar y se guardó hasta realizar la tinción inmunohistoquímica con calcitonina.

La Dra Anna Macià, del grupo de investigación del Dr. Mario Encinas del Instituto de Investigación Biomedica de Lleida (IRBLleida), había realizado el genotipo de Spry1 en los ratones. Los tres grupos de animales, finalmente estudiados, mostraron la siguiente distribución: 18 ratones neonatos (9 Spry-1 KO y 9 Spry-1 WT), 22 ratones de 3 semanas (9 Spry-1 KO, 8 Spry-1 WT y 5 Spry-1 H) y 13 ratones de 13 semanas (6 Spry-1 KO y 7 Spry-1 WT). Tabla III.

Ratones	Spry-1 -/-	Spry-1 +/+ y +/-
0 semanas	9	9
3 semanas	9	13(8+5)
13 semanas	6	7

Tabla IV: Genotipo de los ratones para el gen Spry1. Grupos de ratones separados por edad y numeros de casos de cada genotipo.

Queremos destacar que esta Información permaneció oculta hasta finalizar el recuento de las células calcitonina positivas.

3.2.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

El apartado de inmunohistoquímica se describe separando los tres estudios realizados:

3.2.3.1 Estudio de la familia de proteínas NF- κ B y sus genes diana en CMT

Los cortes se desparafinaron en xileno, se rehidrataron sumergiéndolos en una serie decreciente de etanol y se lavaron con buffer fosfato salino. Se procedió a la recuperación antigénica de los tumores, mediante tratamiento con calor, en olla a presión durante 2 minutos, sumergidos en 10 mmol/l de buffer citrato (pH: 6,5) o buffer EDTA (pH 8.0), y posterior bloqueo de la peroxidasa endógena.

La evaluación inmunohistoquímica incluyó los miembros de la familia NF- κ B (p65, p50, p52, c-rel y Rel-B) y 3 posibles dianas: FLIP, Bcl-XL y Ciclina D1. Tras la incubación, se reveló con el kit EnVision (DAKO; Glostrup, Denmark) usando el cromógeno diaminobencidina (DAB) como sustrato. Los cortes se contrastaron con hematoxilina. Se usaron controles apropiados

positivos y negativos tanto externos como internos. La preservación antigénica se verificó con tinción inmunohistoquímica para Vimentina y Ki-67 (Tabla V).

Tras verificar la preservación antigénica con tinción inmunohistoquímica para Vimentina y Ki-67 se consideraron válidos 53/73 casos.

El estudio inmunohistoquímico fué evaluado por 3 patólogos siguiendo criterios uniformes preestablecidos. La inmunoreactividad se evaluó de forma semi-cuantitativa, considerando porcentaje e intensidad de la tinción. Los antígenos nucleares se valoraron a partir del 5% de positividad. En todos los antígenos se obtuvo una puntuación de cada muestra, con un rango de 0 (no inmunoreacción) a 300 (máxima inmunorreactividad). La puntuación se obtuvo aplicando la siguiente fórmula Histoscore (Hs) = 1x (% de tinción débil) + 2x (% de tinción moderada) + 3x (% de tinción intensa). La valoración inmunohistoquímica se hizo tras examinar los 2 cilindros de cada tumor.

Proteína	Clon	Proveedor	Dilución
VIMENTINA	policlonal	Dako	1:50
KI-67	MIB-1	Dako	1:100
P-50	policlonal	Santa Cruz	1:50
P-52	policlonal	Santa Cruz	1:100
P-65(sc8008)	F6(p65)	Santa Cruz	1:2000
P-65(sc-372)	Policlonal	Santa Cruz	1:100
P-65(sc-109)	Policlonal	Santa Cruz	1:100
REL-B	policlonal	Santa Cruz	1:50
C-REL	policlonal	Santa Cruz	1:250
FLIP	policlonal	Santa Cruz	1:10
BCL-XL	2H12	Zimed	1:10
CICLINA D1	DCS6	Dako	1:25

Tabla V: Anticuerpos utilizados en el estudio.

3.2.3.2 Evaluación de las células C en dos grupos de ratones.

Se procedió a desparafinar en xileno, rehidratar y lavar 20 minutos en solución de buffer citrato y se desenmascararon antígenos por calor a pH 6,5, en el dispositivo PT link (DAKO).

3.2.3.2.1 Tinción de calcitonina

Las secciones obtenidas se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-calcitonina “Ready-to use” (DAKO ,cat # IR515) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se reveló con el kit Envision Detection (DAKO) usando como sustrato el cromógeno DAB. Las secciones se contrastaron con hematoxilina.

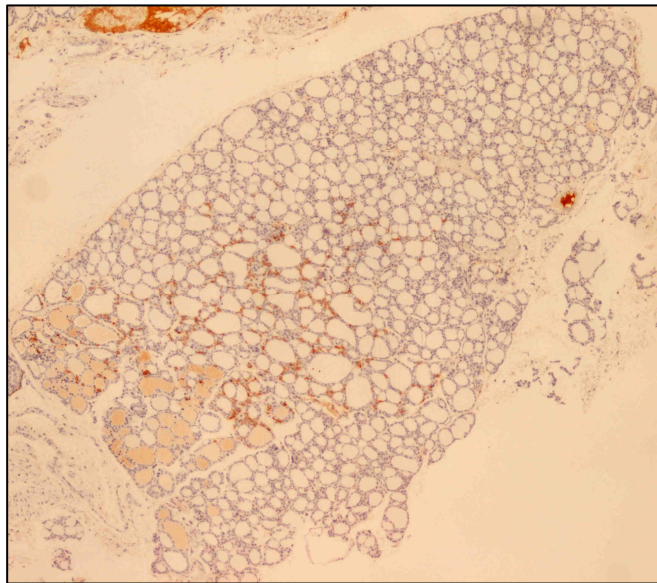


Fig.nº 14. Imagen microscopica del corte de un lóbulo de tiroides de un ratón Spry1KO tras la tinción inmunohistoquímica de calcitonina. Se identifican de color marrón las células positivas.

De cada animal hemos evaluado una media de 28 cortes. Hemos eliminado las laminillas sin células C o con un número indeterminado. En cada laminilla,

hemos contado las células positivas para calcitonina, de cada corte y de un solo lóbulo tiroideo (generalmente el mejor conservado).

Recordamos que el estudio lo hemos realizado sin conocer el genotipo de los ratones.

3.2.3.3 Estudio inmunohistoquímico comparativo de 6 proteínas entre los PGL y CMT.

3.2.3.3.1 Selección de las proteínas para análisis inmunohistoquímico

En el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), se había realizado un mapa génico de PGL de cabeza y cuello y de CMT, estudiando mediante microarrays de c-DNA un total de 57 muestras de tumores congelados. Los tumores (9 PGL de cabeza y cuello y 48 CMT) procedían de la Red Nacional del Banco de Tumores y del Instituto Oncológico Véneto en Italia.

De los resultados obtenidos del análisis de microarrays de c-DNA, se seleccionaron 6 genes: NDUFA4L2, COXIV2, VMAT2, CGRP/CALCITONINA, CEA, y TTF-1 que mostraron expresión muy diferenciada entre PGL y CMT para su posterior validación inmunohistoquímica. Todos los genes seleccionados presentaban un fold-change en escala logarítmica binaria superior a 1,9 unidades absolutas y, a la vez, False Discovery Rate inferior a 0,01, y además, se disponía de un anticuerpo comercial.

3.2.3.3.2 Tinción inmunohistoquímica

Los cortes histológicos (TMA y secciones completas) de este estudio se desparafinaron en xileno, se rehidrataron sumergiéndolos en una serie decreciente de etanol y se lavaron con buffer fosfato salino. La recuperación antigénica se realizó por tratamiento con calor, en un PT Link (Dako, Glostrup, Denmark) a pH9 o pH6. Se bloqueó la peroxidasa endógena.

La evaluación inmunohistoquímica incluyó las siguientes proteínas: NADH dehidrogenasa 1 subcomplejo alfa, 4-like 2 (NDUFA4L2), isoforma 2 subunidad IV citocromo c oxidasa (COXIV2), transportador monoamina vesicular 2 (VMAT2), proteína relacionada con el gen de la calcitonina (CGRP), calcitonina, antígeno carcinoembrionario (CEA), y factor de transcripción tiroideo 1 (TTF-1) Tabla VI.

La reacción inmunohistoquímica se reveló con EnVision™ FLEX (DAKO, Glostrup, Denmark) usando DAB como sustrato. Las secciones se contrastaron con hematoxilina. Se usaron controles apropiados positivos y negativos tanto externos como internos. La preservación antigénica se verificó con la tinción inmunohistoquímica para Vimentina y Ki-67. El estudio inmunohistoquímico fue evaluado por 3 patólogos siguiendo criterios uniformes preestablecidos. La inmunoreactividad se evaluó de forma semi-cuantitativa de Hs considerando porcentaje e intensidad de la tinción (fórmula ya descrita anteriormente).

Por otro lado, se analizó la inmunoexpresión, de las 6 proteínas ya mencionadas, en secciones de parafina completas de las doce metástasis de CMT adicionales y los cuatro casos de PT,

Proteína	Clon	Proveedor	Dilución
NDUFA4L2	Pollclonal	ProteinTech	1:500
COXIV2	Pollclonal	Abcam	1:4000
VMAT2	Pollclonal	Abcam	1:4000
CGRP	4901	Abcam	1:500
CEA	IR526 o IS526	Dako	Prediluido
TTF-1	8G7G3/1	Dako	Prediluido
CALCITONINA	Pollclonal	Dako	Prediluido

Tabla VI. Anticuerpos usados en el estudio de diagnóstico diferencial entre CMT y PGL de cabeza y cuello.

3.3.4 METODOS ESTADISTICOS

Para el análisis estadístico se contó con la colaboración de la unidad de bioestadística del IRBLLEIDA. Se usaron procedimientos diferentes que se describen en 3 apartados diferenciados.

1.-Estudio inmunohistoquímico de la familia de proteínas NF-kB y sus posibles dianas en CMT

El test exacto de Fisher se utilizó para evaluar la asociación entre variables categóricas. La suma de rangos de Wilcoxon y el test de Kruskal Wallis y ANOVA se utilizaron para confirmar la asociación entre variables continuas y categóricas. La correlación de rangos de Spearman se aplicó para evaluar la asociación entre variables ordinales y/o continuas.

2.-Evaluación de las células C en dos grupos de ratones, uno de ellos con delección selectiva de Spry1.

Se analizaron los datos del total de células C mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal–Wallis, según si la comparación se hacía entre dos o entre más grupos respectivamente. Además se ajustó un modelo de regresión lineal generalizado utilizando como distribución la binomial negativa.

3.-Estudio inmunohistoquímico comparativo de 6 proteínas entre PGL Y CMT

Las diferencias de expresión, por inmunohistoquímica, entre las muestras de PGL y CMT se evaluaron mediante la diferencia absoluta, calculando también el fold-change para medir las diferencias relativas. Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Se diseñaron árboles de clasificación para construir un método discriminativo con el que predecir cada tipo de muestra (PGL o CMT) a partir de los valores de expresión obtenidos por inmunohistoquímica. Se fijó el índice de Gini para determinar las particiones binarias recursivas y para validar el

árbol, se procedió a una validación interna, que permitió evaluar el error de predicción.

3.3.4.1 Programa estadístico y significación

Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa estadístico R, fijando la significación estadística a un nivel de 0.05.

4. RESULTADOS

Los resultados se describen en tres apartados correspondientes a cada estudio realizado:

4.1 Resultados del estudio inmunohistoquímico de la familia de proteínas NF- κ B y sus genes diana en el CMT.

La inmunotinción nuclear de los miembros de NF- κ B mostró una variación desde el 19% hasta casi el 90% según la proteína. En concreto, detectamos p50 en 9 casos de 47 (19,15%), p65 en 32 casos de 48 (65,67%), p52 en 39 casos de 45 (86,67%), c-rel en 33 casos de 44 (75%) y, finalmente, RelB en 16 casos de 44 (36,36%) (Fig.13, 14 y 15). Cabe remarcar que, observamos la positividad nuclear de una o más subunidades de NF- κ B (p65, p50, p52, c-rel, Rel-B), valorada en conjunto, en la casi totalidad de casos, concretamente en 47 casos de 48 (97,92%).

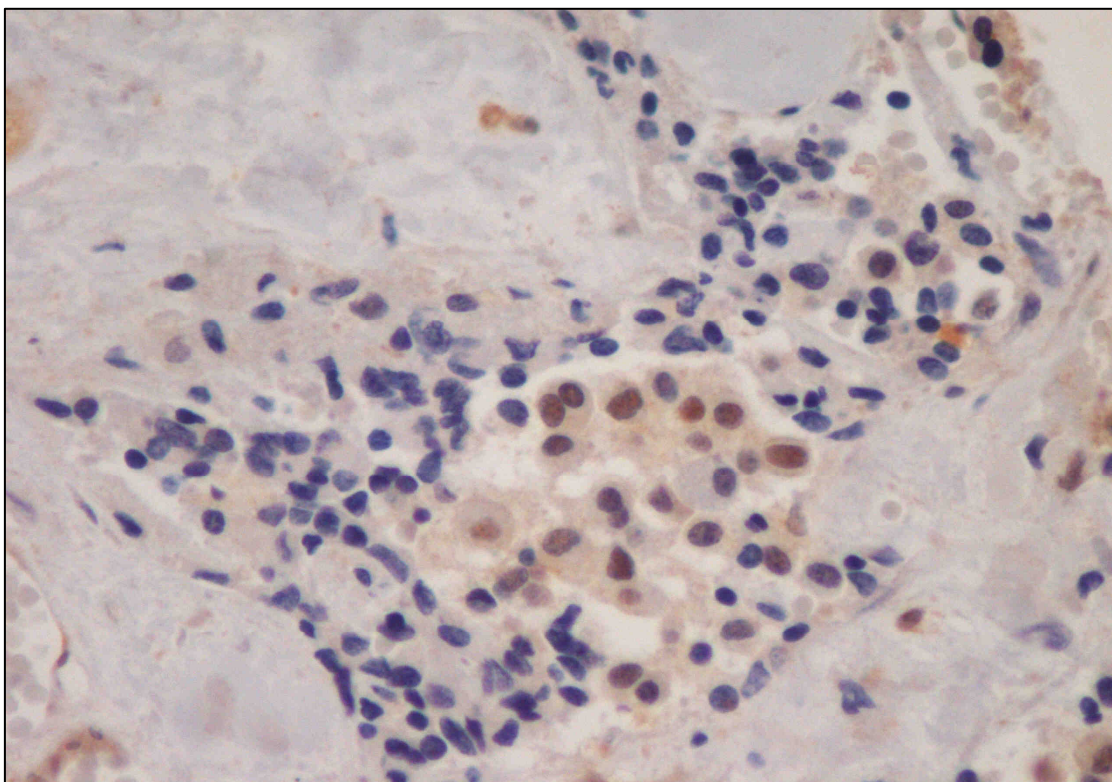


Fig.15: Aspecto microscópico de un CMT con tinción inmunohistoquímica nuclear de p50.

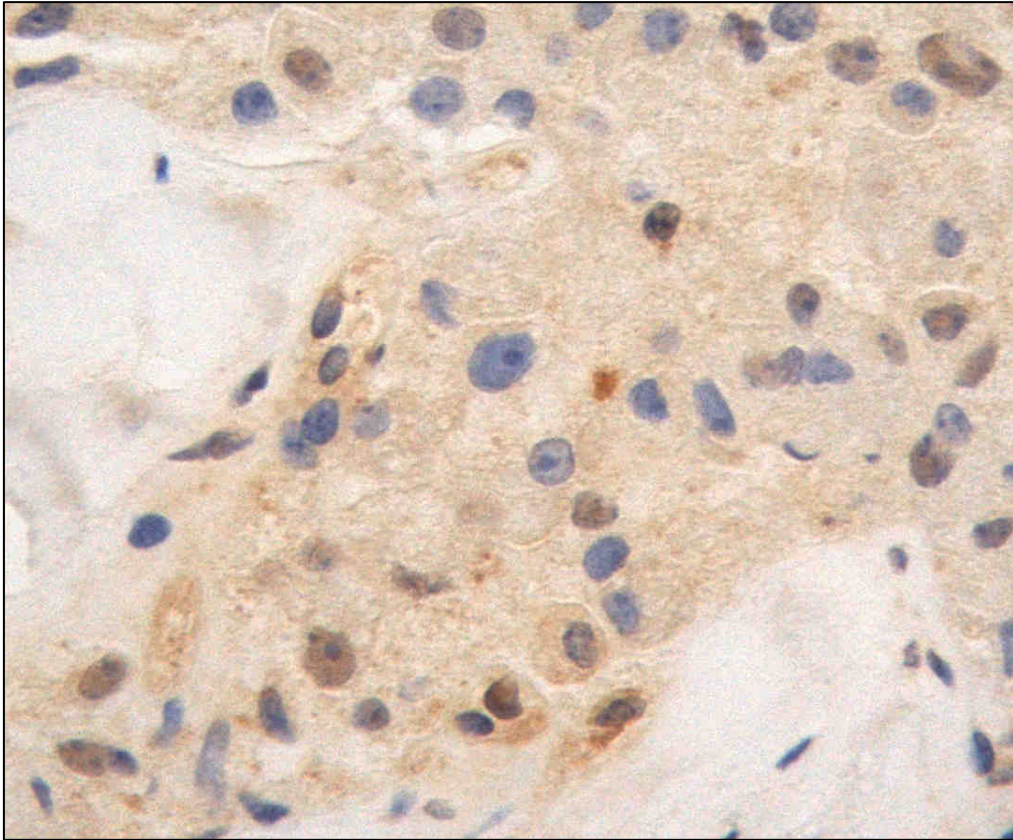


Fig. 16: Detalle de la tinción inmunohistoquímica nuclear de p65 en otro CMT.

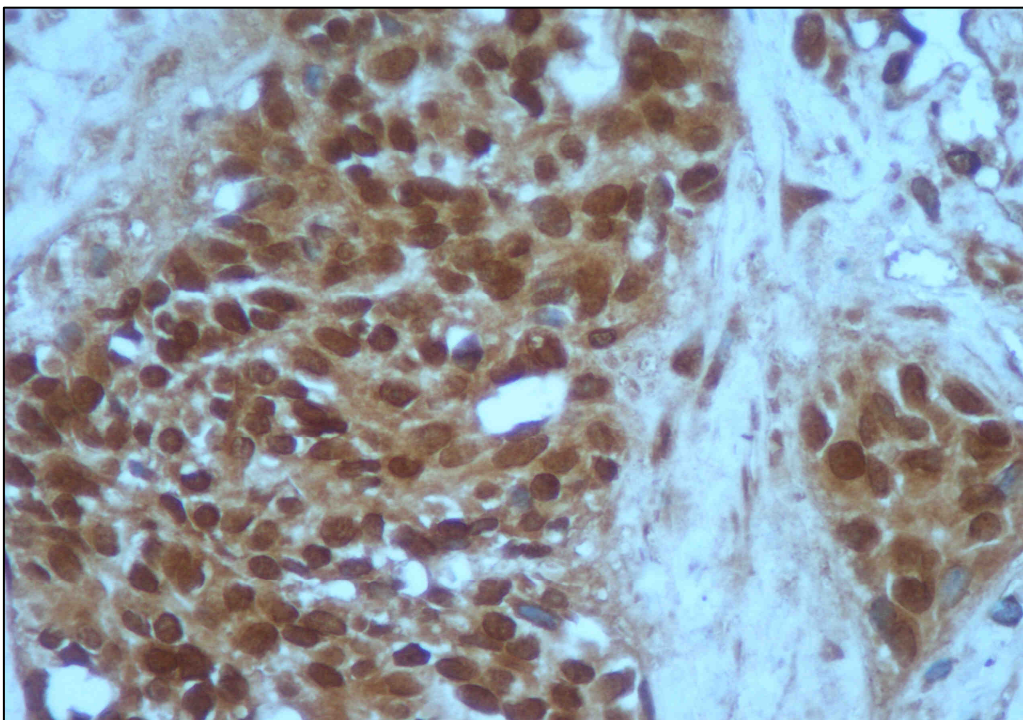


Fig.17: Tinción inmunohistoquímica de p52 positiva difusa, tanto en el citoplasma como en el núcleo, de uno de los tumores de la serie.

La tabla VII muestra los resultados obtenidos al analizar la relación entre la mutación de RET y la traslocación de distintas subunidades de NF- κ B. En general, no hallamos ninguna asociación estadísticamente significativa, si bien para P65, en uno de los tres anticuerpos estudiados (P65SC372), alcanza la significación estadística ($p=0.035$), observándose una mayor proporción de traslocaciones nucleares de P65 para los casos con mutación de RET (53,57% respecto 22,22% y 75,86% respecto 52,63% en general), suficiente para concluir asociación entre p65 y la mutación de RET

Subunidades NF- κ B	RET mutado	RET no mutado	p-valor
P50	5/29 (17, 24%)	4/18 (22, 22%)	1
P65 (alguno de los anticuerpos)	22/29 (75, 86%)	10/19 (52, 63%)	0,2
P65SC8008	16/29(55,17%)	7/18 (38, 89%)	0,37
P65SC372	15/28 (53,57%)	4/18 (22,22%)	0,035
P65SC109	9/29(27, 59%)	7/18 (38, 89%)	0,75
P52	26/28 (92, 85%)	13/17 (76,47%)	0,28
Rel-B	10/27(37, 03%)	6/17(35,29)	1
c-rel	22/28(78,57%)	11/16(68,75%)	0,68

Tabla VII. Asociación entre subunidades de NF- κ B y RET. La tabla muestra la frecuencia de casos con expresión nuclear para cada una de las proteínas respecto al total de casos, diferenciando cuando éstos presentan mutación de RET (entre paréntesis el porcentaje). La última columna muestra los resultados de la prueba de Fisher para evaluar la asociación estadística entre la expresión nuclear de las proteínas y la mutación de RET. Para P65, se avaluó la positividad por inmunohistoquímica utilizando tres anticuerpos diferentes, mostrando en la tabla la positividad global para, al menos, alguno de ellos.

*Se destaca en negrita el único resultado estadísticamente significativo.

Cuando se analiza la relación según el tipo de exón mutado, no se hallan diferencias significativas (Tabla VIII).

Subunidades NF-κB	RET mutado Exón 10-11 germinal	RET mutado Exón 16-11 somática	RET no mutado	p-valor
P50	1/14 (7,14%)	4/15 (26,66%)	4/18 (22, 22%)	0,41
P65 alguno de los anticuerpos	6/14 (42,85%)	10/15 (66,66%)	10/18 (55, 56%)	0,47
P52	12/13 (93,30%)	14/15 (93,33%)	13/17 (76,47%)	0,34
Rel-B	3/12 (25%)	7/15 (46,66%)	6/17 (35,29%)	0,57
c-rel	11/13 (84,61%)	11/15 (73,33%)	11/16 (68,75%)	0,62

Tabla VIII. Asociación entre subunidades de NF- κ B y RETmutado según el exón. La tabla muestra la frecuencia de casos con expresión nuclear para cada una de las proteínas respecto al total de casos, diferenciando cuando éstos presentan mutación de RET (germinal o somática) o no, (entre paréntesis el porcentaje). La última columna muestra los resultados de la prueba de Fisher para evaluar la asociación estadística entre la expresión nuclear de las proteínas y la presencia de mutación de RET. Para P65, se avaluó la positividad por inmunohistoquímica utilizando tres anticuerpos diferentes, mostrando en la tabla la positividad global para, al menos, alguno de ellos.

La 2º parte corresponde a la tinción inmunohistoquímica de las posibles dianas de NF- κ B permitió detectar positividad (definido como un Hs superior a 0) en 39 de 45 casos (86,6%) para FLIP (Fig. 16) , 42 de 48 casos (87,5%) para Bcl-xL (Fig.18) y en 44 de 45 casos (97,7%) para ciclina D1. Además, en la tabla IX analizamos las diferencias en los niveles de immunoexpresión de estos genes según la mutación de RET (no mutación, mutación germinal o mutación somática), pudiendo constatar diferencias significativas para Bcl-xL

($p=0.02$), observamos mayores niveles de expresión para las muestras con mutación somática (media 152,81), respecto a los valores observados para los casos no mutados o aquellos con mutación germinal (medias 106,42 y 94,23 respectivamente). Conviene remarcar que en Gallel et al (2008) la tabla 5 se refiere exclusivamente a los casos con tinción positiva (Hs superior a 0) y considera muestras de tumor primario y metástasis como un único caso.

Dianas de NF-kB	Mutación RET germinal	Mutación RET somática	RET no mutado	Total casos positivos	p-valor ANOVA
FLIP	12 (26,67%) m:126,08 r(0-290)	16 (35,56%) m:123,12 r(0-210)	17 (37,78%) m:103,24 r(0-200)	45 (100%)	0,65
Bcl-xL	13 (27,08%) m:94,23 r(0-160)	16 (33,33%) m:152,81 r(0-240)	19 (39,58%) m:106,42 r(0-185)	48 (100%)	0,02
Ciclina D-1	12 (26,67%) m:44,16 r(10-80)	16 (35,56%) m:31,21 r(5-70)	17 (37,78%) m:41,76 r (0-90)	45 (100%)	0,36

Tabla IX: Relación entre la inmunoexpresión de los genes diana de NF-kB y el estatus mutacional de RET La tabla contiene las frecuencias de casos (porcentaje) según mutación y, para cada grupo se muestra la media y el rango para FLIP, Bcl-xL y ciclina D1, evaluando las diferencias a partir de una prueba ANOVA.

* Se destaca en negrita el valor estadísticamente significativo.

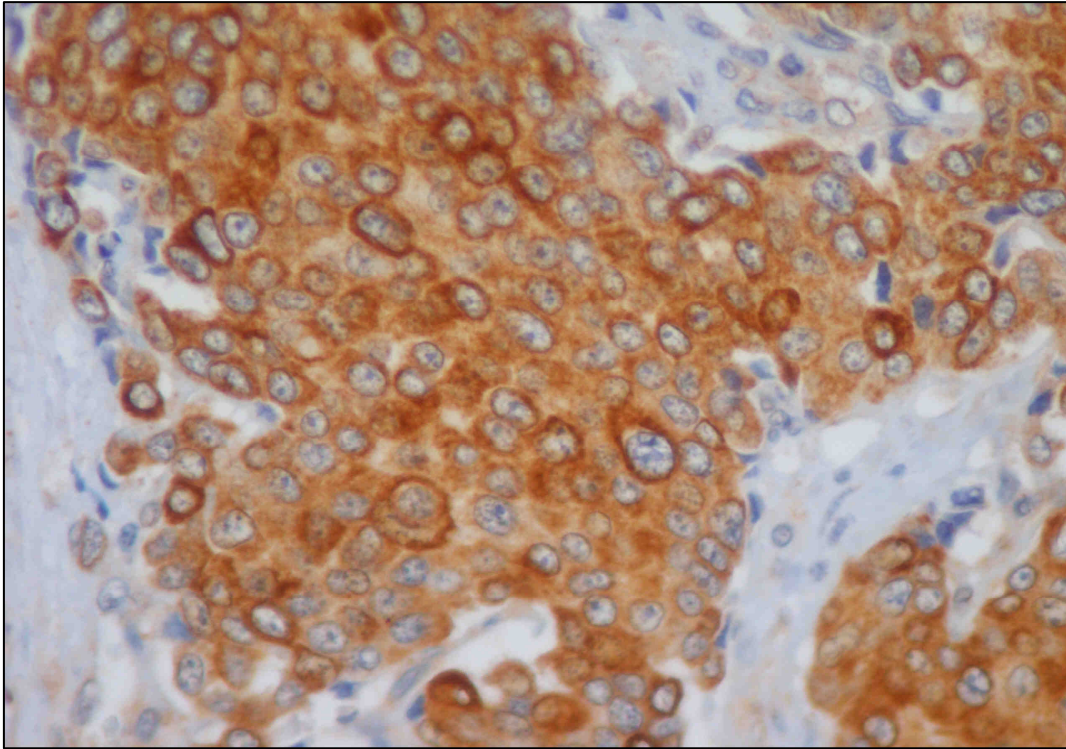


Fig.16: Imagen de la tinción inmunohistoquímica citoplasmática y de membrana de FLIP, en un CMT.

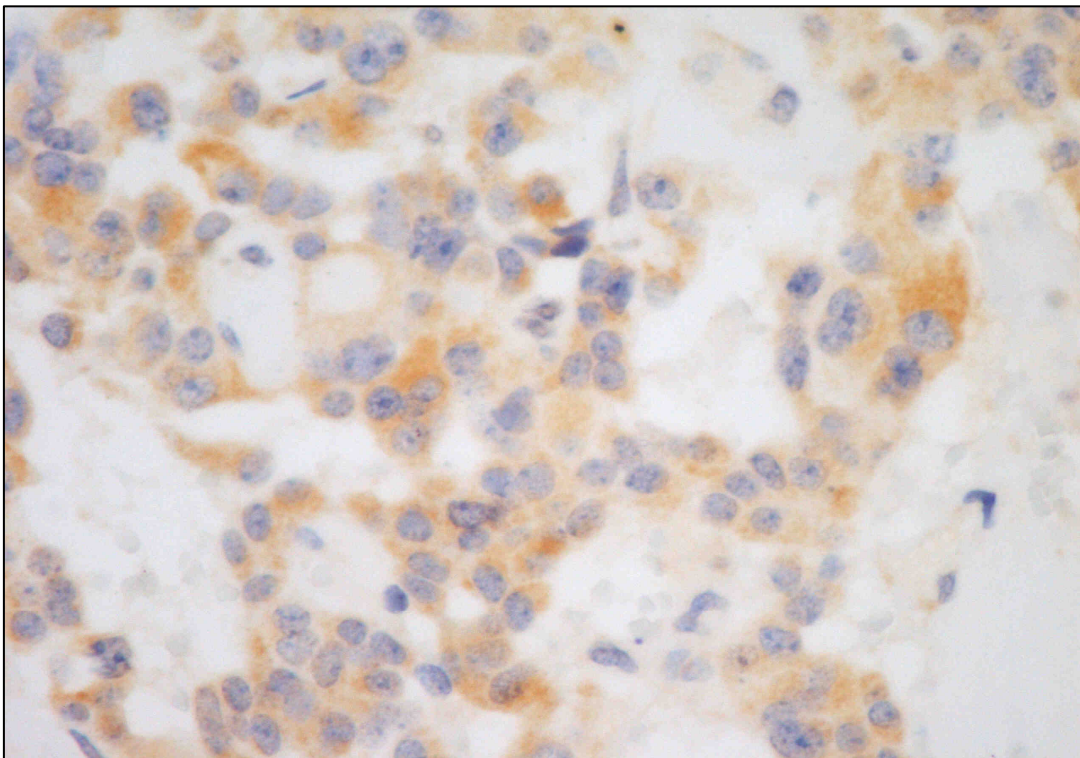


Fig.19. La imagen de la tinción inmunohistoquímica de Bcl-XL en uno de los tumores de la serie (citoplasmática)

La tabla X muestra los resultados positivos o negativos obtenidos en los tres genes diana de NF-kB (FLIP, Bc-xL y ciclina D1) para los casos con expresión de las diferentes proteínas de NF-kB. Éstos mostraron que la positividad (definida como Hs superior a 0) se da claramente en la práctica totalidad de los casos para p50, p52, c-rel y Rel B, siendo el porcentaje de positividad superior al 94% en todos los casos. En cambio, la proteína p65 mostró niveles de positividad inferiores al 72%.

Subunidades de NF-kB	FLIP (Pos/Neg)	Bc-xL (Pos/Neg)	Ciclina D1 (Pos/Neg)
P50	9/0 (100%)	9/0 (100%)	19/0 (100%)
P65(sc8008)	21/11 (65,62%)	23/9 (71,87%)	21/11 (65,62%)
P52	38/1 (97,44%)	39/0 (100%)	38/1 (97,44%)
c-rel	33/0 (100%)	33/0 (100%)	33/0 (100%)
Rel B	15/1 (93,75%)	16/0 (100%)	16/0 (100%)

Tabla X: Asociación entre los casos con expresión de las subunidades de NF-kB y los tres genes diana. Se muestra la frecuencia de casos positivos/negativos para cada uno de los genes diana de NF-kB (FLIP, Bc-xL y Ciclina D1) y el porcentaje de positividad (definida como Hs superior a 0). Las frecuencias solo refieren a los casos con expresión de NF-kB.

Por último la tabla XI evalúa las diferencias en los niveles de immunoexpresión de Bcl-xL, FLIP y Ciclina D-1 según la traslocación de P65. Los resultados obtenidos indican que Bcl-xL presenta unos mayores niveles de expresión cuando los tumores presenta traslocación de p65 (medias 151,19 respecto 126,33), alcanzando la significación estadística ($p=0,024$). En cambio, para FLIP y Ciclina D-1 no se constatan diferencias significativas.

Dianas de NF-kB	Traslocación de P65	No traslocación de P65	Total casos	p-valor Mann-Whitney
Bcl-xL	23 (48,94%) m:151,39 r (0-240)	24 (51,06%) m:126,33 r (0-190)	47 (100%)	0,024
FLIP	21 (47,72%) m:126,33 r (0-210)	23 (52,27%) m:106,74 r(0-290)	44 (100%)	0,13
Ciclina D-1	21 (48,83%) m:37,14 r(5- 80)	22 (51,17%) m:39,13 r(0-90)	43 (100%)	0,28

Tabla X: Relación entre la immunoexpresión de las dianas de NF-KB y la traslocación nuclear de P65. Se muestra el número de casos (y porcentajes) y las medias y rangos de immunoexpresión observados, según la traslocación de P65 en el tumor, evaluando las diferencias entre las medias mediante la prueba de Mann-Whitney.

*Se destaca en negrita el único valor estadísticamente significativo.

El estudio de las diferencias en los niveles de immunoexpresión de las dianas de NF-kB según la translocación de P50, P52, Rel-B y C-rel, no detectó ninguna diferencia estadística significativa (resultados no mostrados).

4.2 Resultados de la evaluación de las células C en dos grupos de ratones, uno de ellos, modificado genéticamente para *spry1* (delección completa)

4.2.1 Estudio piloto

Realizamos un estudio con una muestra total de 22 ratones. Un grupo de 9 animales de tipo salvaje (*Spry1*WT) o heterocigotos (*Spry1*H) y otro grupo 13 animales con delección completa de *Spry1* (*Spry1*KO). Observamos que las glándulas tiroides de los ratones *Spry1*KO pesaban más y la tinción de calcitonina mostraba más células C que las glándulas de tipo *Spry1*WT-H. Imagen de la tinción de calcitonina (Fig.20).

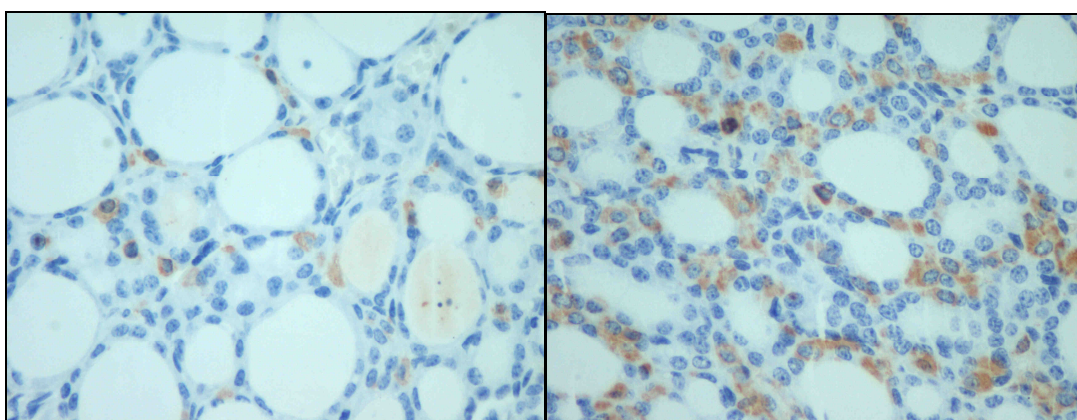


Fig 20: Imágenes microscópicas de las glándulas tiroides de los ratones a 400x. Tinción inmunohistoquímica de calcitonina. I: Ratón *Spry1* WT con 1 o 2 células C por folículo tiroideo. D: Ratón *Spry1* KO con numerosas (4-5) células C por folículo tiroideo.

4.2.2 Estudio completo: fases 1 y 2

FASE 1: PARA CONFIRMAR LA IMPRESIÓN DE HIPERPLASIA DE CÉLULAS C EN LOS RATONES SPRY1KO, SE REALIZO LA COMPARACION DE LAS CÉLULAS C, EN DOS GRUPOS DE RATONES SPRY1 KO O NO, A DOS EDADES DIFERENTES: RECIÉN NACIDOS (P0) Y DE 3 SEMANAS (P3 SEMANAS).

Grupo de ratones P0 (9 Spry1 KO y 9 Spry1 WT)

En los ratones P0, la comparación de las medianas de las células contabilizadas en las distintas laminillas analizadas, de los grupos Spry1KO y Spry1WT, según la prueba no paramétrica de Mann-Whitney proporcionó una diferencia entre las medianas de los dos grupos de 27.50 con un p valor de 0.05994, que no es estadísticamente significativa.

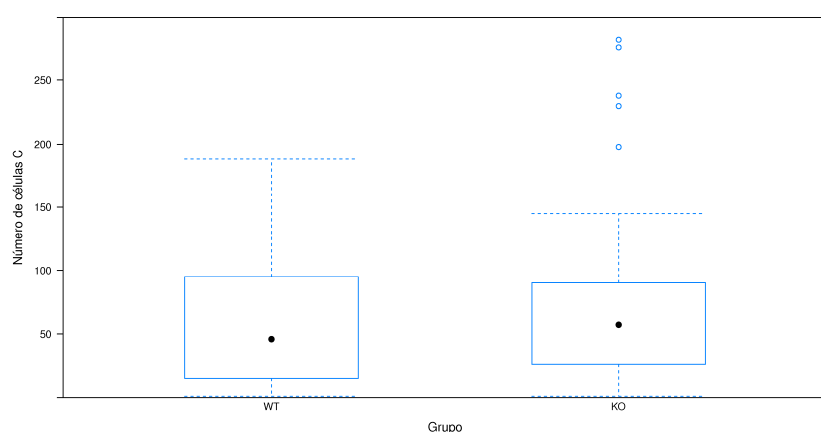


Fig.21. Gráfica con las medianas de los 2 grupos de ratones Spry1 WT y Spry1 KO.
La gráfica muestra que la diferencia de las medianas, no llega a ser estadísticamente significativa en recién nacidos.

Grupo de ratones P3 semanas (7 Spry1 KO y 7 Spry1 WT/H)

Según la prueba no paramétrica de Mann-Whitney la diferencia entre las medianas (P50) de las células C de los ratones de tipo KO y las de los otros tipos de ratones es de 77.50 con un p valor de 0.00699. Por lo tanto la diferencia entre las medianas de los ratones de los 2 grupos (Spry1KO y Spry1WT-H) es estadísticamente significativa.

El modelo de regresión para los datos de cada corte, basado en la distribución binomial negativa, (que tiene en cuenta que el recuento de células C de las laminillas pertenecen a un ratón determinado), indica que el grupo (KO o no) es también un factor estadísticamente significativo, con un p- valor de 0.0019.

Se estima que los ratones Spry1KO tienen un valor de 0.6134 unidades superior comparado con los ratones Spry1WT-H. Por lo tanto, los ratones Spry1KO en comparación con el resto de los ratones se espera que tengan un número de células 1.8466 veces superior al cabo de 3 semanas de vida.

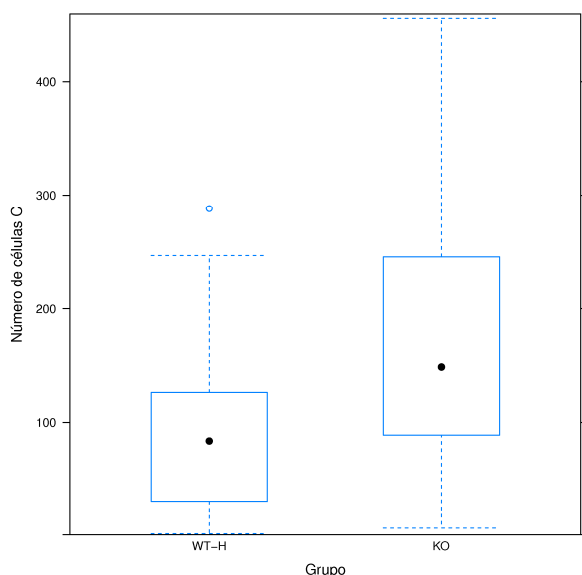


Fig. 22 Gráfica con las medianas de los 2 grupos de ratones Spry1 WT-H y Spry1 KO. La grafica muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a las 3semanas

FASE2: COMPARACIÓN DE LA HIPERPLASIA DE LAS CÉLULAS C EN LOS DOS GRUPOS DE RATONES (SPRY1 KO O NO) A TRES CORTES DE EDAD DIFERENTES (P0, P3, P13).

Para determinar si la hiperplasia de células C se desarrolla en adultos o refleja un incremento en el número de células C a una edad muy temprana, se compararon los resultados de los dos grupos de ratones (Spry1KO y Spry1WT-H) a tres edades diferentes (P0, P3 semanas, P13 semanas).

Diseñamos un estudio ampliado. Aumentamos el grupo de ratones de 3 semanas (P3 semanas) hasta un total de 23 animales y añadimos un nuevo grupo de 12 ratones de 13 semanas (P13 semanas). Por lo tanto contábamos con una muestra total de 53 animales: 18 ratones neonatos: (9 Spry1KO y 9 Spry1WT), 22 ratones de 3 semanas (12 Spry1KO, 7 Spry1WT y 4 Spry1H) y 12 ratones de 13 semanas (6 Spry1KO y 6 Spry1WT) Tabla IX.

Ratones	Spry1 -/-	Spry1 +/+ y +/-
0 semanas	9	9
3 semanas	12	11 (7+4)
13 semanas	6	6

Tabla IX. Genotipo del grupo total de a animales separados por edad.

Para confirmar los datos en el siguiente análisis estadístico sumamos las células C de todas las laminillas de cada tipo ratón, pero separados por edad, y se compararon las medianas de los 2 grupos de ratones, en las 3 edades estudiadas Tabla X.

Edad (sem)	Grupo	Muestra	P25	Mediana	P75	Media	Desv.
0	WT/H	9	643,0	890	1162,0	1078,0	665,61
	KO	9	698,0	1493	1679,0	1282,4	705,57
3	WT-H	11	2294,0	2757	4262,0	3342,2	1551,57
	KO	12	3542,3	5532	5978,3	5126,3	2171,25
13	WT-H	6	3462,0	4798	5585,8	4614,8	1645,38
	KO	6	4779,8	6905	8464,0	6622,3	2147,21

Tabla X. Datos promedio de la suma de las células C de cada gruposeparados por la edad del ratón.

En el grupo de ratones P3 semanas, según la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, la diferencia de la mediana (P50) de los ratones de tipo Spry1KO y los valores del otro tipo de ratones es de 57,10 (IC 95%: [9,00, 105,50]), con un valor p de 0.01160. Por lo tanto, la diferencia entre las medianas de los ratones de los dos grupos es estadísticamente significativa.

En los ratones P13 semanas, según la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, la diferencia de las medianas (P50) de los ratones de tipo Spry1KO y los valores de los otros tipos de ratón es de 13,30 (IC95%: [-32,50, 69,50]), con un valor p de 0.6282. Por lo tanto, la diferencia entre las medianas de los ratones de los grupos no es estadísticamente significativa.

Considerando el modelo con todos los ratones, se tendrá más potencia para detectar las diferencias significativas entre los dos tipos de ratones (Spry1KO o no), de la que se tenía analizando las diferencias independientemente en cada grupo de edad.

Ratones	Coef (SE)	Exp(Coef)[95% CI]	p-valor
Constante	6,90(0,125)	1001,59 [793,72-1282,79]	<0,001
KO (ref. WT/HETERO)	0,33(0,125)	1,39 [1,08- 1,77]	<0,009
Edad (ref neonatos)			
3 semanas	1,26(0,144)	3,52 [2,65- 4,67]	<0,001
13 semanas	1,55(0,170)	4,69 [3,37- 6,57]	<0,001

***Theta(SE) = 4,81 (0,907)**

Tabla XI. Coeficientes del modelo de regresión binomial negativo por promedio de células C.

Por lo tanto, el modelo predice una mediana de células C de 1001,59 y hay diferencias estadísticamente significativas entre los ratones del tipo Spry1WT-H versus los Spry1KO. Los ratones del tipo Spry1KO tienen más células C de forma significativa, y en promedio multiplican por 1,39 el número de células C

de un ratón Spry1WT-H de la misma edad. Por último, el número de células C aumenta significativamente con la edad y respecto al neonato, los ratones de 3 semanas multiplican el número de células C por 3,52 y los ratones de 13 semanas lo multiplican un promedio de 4,69. Por lo tanto, el aumento de células C con la edad no es lineal, pero parece deducirse que es monótono creciente (Fig.23).

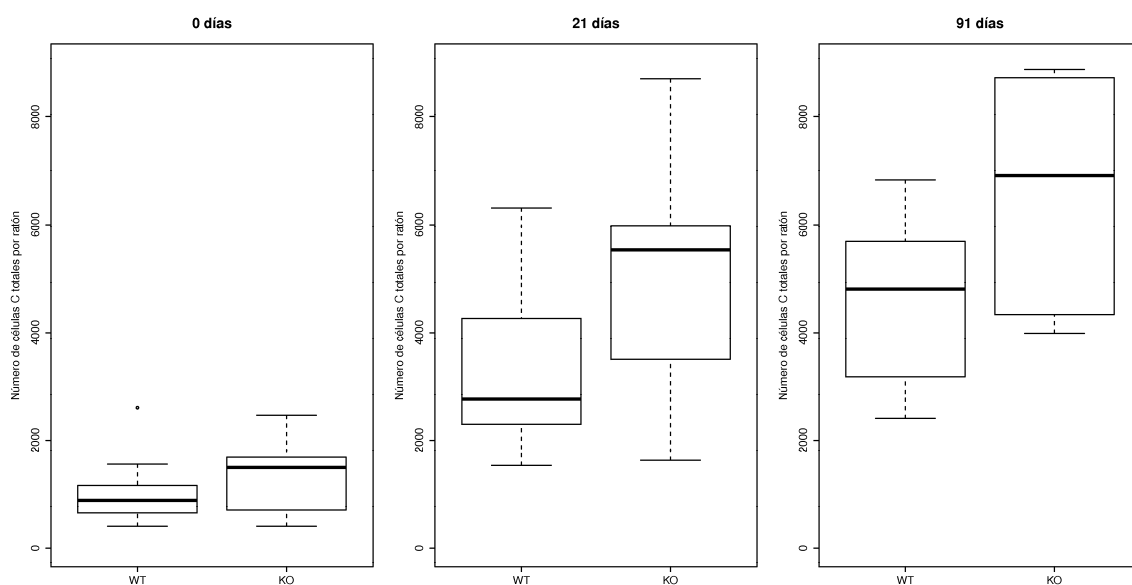


Fig. 23: Gráficos comparativos del incremento de células C con la edad de los ratones. Los ratones Spry1KO aumentan el número de células C respecto a los ratones Spry1WT-H, de forma monótona creciente.

4.3 Resultados del estudio inmunohistoquímico comparativo entre PGL de cabeza y cuello, y CMT.

4.3.1 Análisis diferencial y validación del TMA.

La valoración de la tinción inmunohistoquímica citoplasmática de los PGL frente CMT, mostró que la expresión de NDUFA4L2 fue 1,44 veces mayor en PGL que en los CMT, alcanzando la significación estadística (media PGL Hs 215; rango 112,5 – 285; media MTC Hs 148; rango 100 – 206, p-valor =0.00005), de VMAT2 fue 1,18 veces mayor en PGL respecto a CMT, diferencia estadísticamente significativa (media PGL Hs 98; rango 0 – 130; media MTC Hs 82; rango 20 – 100, p-valor=0,0004 y la expresión de COXIV2 fue 1,22 veces mayor en PGL que en CMT, alcanzando también la significación estadística (media PGL 154; rango 101 – 260; media MTC Hs 126; rango 15 – 165, p-valor=0,008). En contraste, la expresión inmunohistoquímica de CEA, CGRP y calcitonina fue casi nula en los casos de PGL (media de los Hs 0,097 y 1,73, respectivamente) mientras que los casos de MCT mostraron valores significativamente superiores (medias Hs y rangos 150 (0 - 295), 242 (70 - 296), y 253 (168 - 295) respectivamente, p-valor<0,00001 para cada uno de ellos). La evaluación de TTF-1 constató tinción nuclear positiva en numerosos casos de CMT (media de Hs de 73; rango 0 - 205) y ausencia de reactividad en las muestras de PGL (media de Hs 0, rango 0 - 0), alcanzando la significación estadística (p<0,00001) .(Tabla XII).

Hubo una gran concordancia entre la tinción inmunohistoquímica de CGRP y de calcitonina en las muestras de CMT, con un índice de correlación de Pearson de r=0,96, siendo estadísticamente significativo (p< 0,00001).

Anticuerpo		n	min	max	media	PGG/MTC Fold- change	MTC/PGG Fold- change	p-valor
NDUFA4L2.C	PGG	22	112,5	285	215,34	1,45	0,69	0,00005
	MTC	30	100	206,67	148,97			
COXIV2. C	PGG	22	101,67	260	154,39	1,22	0,82	0,008
	MTC	30	15	165	126,29			
VMAT2. C	PGG	23	0	130	98,36	1,19	0,84	0,0004
	MTC	29	20	100	82,72			
CGRP. C	PGG	24	0	125	77,54	0,34	2,91	<0,00001
	MTC	30	17,5	300	225,61			
CEA. C	PGG	24	0	0	0	0	Inf	<0,00001
	MTC	28	0	295	149,85			
TTF1. N	PGG	24	0	0	0	0	Inf	<0,00001
	MTC	30	0	205	72,57			

Tabla XII. Inmunoeexpresión de los marcadores de PGL y CMT. La tabla muestra los valores de inmunoeexpresión mínimos, máximos y medios observados en las muestras PGL y CMT. Se mide la expresión diferencial mediante el fold-change y se evalúa estadísticamente mediante la prueba de Mann-Whitney.

Comprobamos los 7 marcadores tanto en los casos de CMT primarios como en las metástasis. La expresión citoplasmática de NDUFA4L2 fue 2,06 veces mayor en los CMT primarios (media de Hs 147,19) en comparación con las metástasis (media de Hs 71,40) esta diferencia entre ellos es estadísticamente significativa (p-valor=0,0001). De forma parecida, la expresión de VMAT2 fue de 1,96 veces mayor en los CMTs primarios (media de Hs 81,88) que en las metástasis (media de Hs 41,67), también muestra diferencia estadísticamente significativa (p-valor=0,001).

Además los CMTs primarios mostraron más tinción de CGRP que sus metástasis con significación estadística (medias de Hs de 243,13 y 144,53 respectivamente, p-valor =0,009), pero observamos menor tinción de COXIV2 y de CEA en los primarios que en las metástasis con significación estadística (p-valor = 0,03 y 0,02 respectivamente). No se apreciaron diferencias significativas en los marcadores calcitonina y TTF-1 (Tabla XIII).

Anticuerpos	CMT primarios		Metástasis de CMT		Fold-change		p-valor. Mann-Whitney
	n	Media (rango)	Media (rango)	n	Prim. vs Met.	Met. vs prim	p-valor
NDUFA4L2 (cit)	27	147,19 (100-07)	71,4 (0-205)	15	2,06	0,49	0,0001
COXIV2 (cit)	27	123,94 (15-165)	141,83 (50-185)	15	0,87	1,14	0,03
VMAT2 (cit)	26	81,88 (20-100)	41,67 (0-98)	15	1,96	0,51	0,001
VMAT2 (nuc)	26	27,52 (0-123)	6,03 (0-70)	15	4,56	0,22	0,03
TTF1 (nuc)	27	72,63 (0-205)	58,75 (0-159)	15	1,24	0,81	0,76
CEA (cit)	25	146,58 (0-295)	210,42 (20-300)	15	0,70	1,44	0,02
CGRP (cit)	27	243,13 (70-297)	144,53 (0-270)	15	1,68	0,59	0,0009
CALCITON. (cit)	27	253,69 (95-168)	255,36 (200-295)	15	0,99	1,01	0,88

Tabla XIII. Descripción de los valores de immunoexpresión obtenidos para las 7 proteínas testadas en los casos primarios y en las metástasis. Comparación de medias según una prueba de Mann-Whitney. La tabla muestra el cambio relativo (fold-change) de los casos primarios respecto a las metástasis y su recíproco.

Asimismo valoramos la expresión de la inmunotinción nuclear de todos anticuerpos ya mencionados. Resultó negativa en todos los casos de CMT y PGL para los anticuerpos NDUFA4L2, COXIV2, CGRP y CEA. Sin embargo, detectamos la presencia de VMAT2 y TTF1, en los casos de CMT.

4.3.2 Árboles de clasificación y regla de clasificación global

Para predecir el tipo de tumor (PGL o CMT) obtuvimos cuatro árboles de clasificación. El primero se obtuvo construyendo el árbol usando todos los predictores potenciales (NDUFA4L2, COXIV2, VMAT2, CEA, CGRP/ calcitonina y TTF-1) y dió como resultado un árbol con un solo predictor, estableciendo un punto de corte en 10 unidades en la escala Hs para CGRP (Fig 24). Dicho árbol, por si mismo, es capaz de determinar con total exactitud el tipo histológico con un error de predicción, que incluso para las validaciones cruzadas, fue del 0%. Dada la alta concordancia entre CGRP y calcitonina, se obtuvo un segundo árbol, sin considerar CGRP como predictor potencial, resultando también un árbol con un único predictor, calcitonina, con un punto de corte en 50 unidades en la escala Hs (Fig 24 A y B).

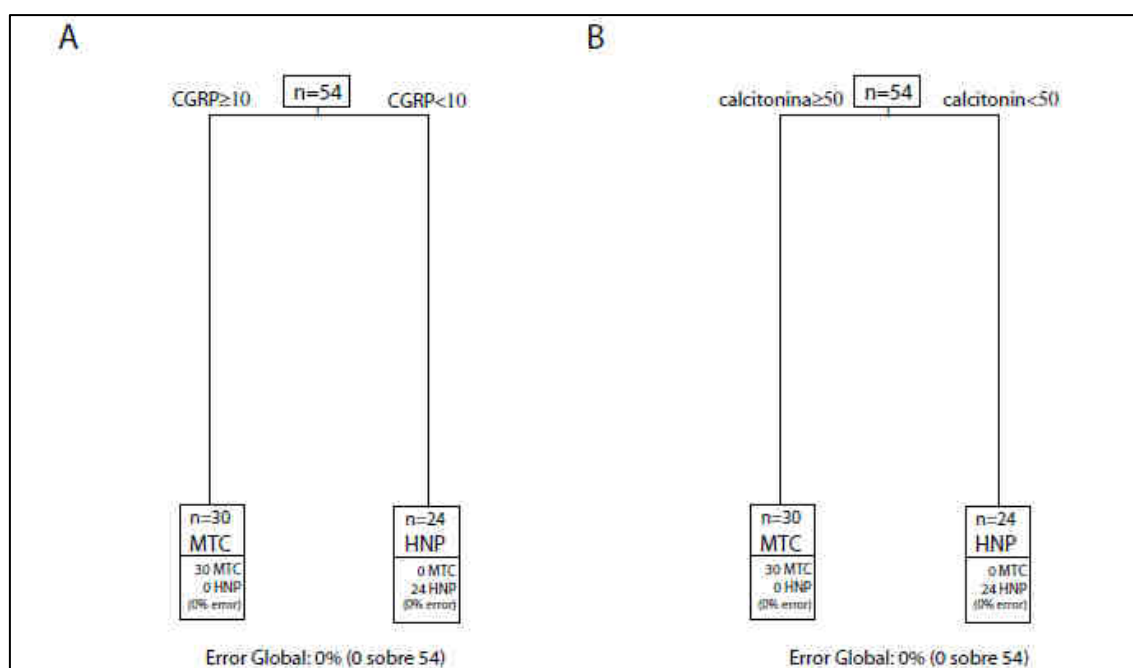


Fig. 24 A y B: Árboles con un solo predictor: CGRP(A) o calcitonina (B).

Para investigar más a fondo otras alternativas se procedió a ajustar los árboles incluyendo solamente las variables NDUFA4L2, COXIV2 y VMAT2 como potenciales valores de predicción, dado su elevado nivel de expresión para las muestras PGL. Esto dió como resultado dos diferentes árboles de clasificación, combinando NDUFA4L2 con VMAT2 o con COXIV2 respectivamente. De hecho, ambos árboles predicen que será PGL cuando los niveles de expresión por inmunohistoquímica de NDUFA4L2 son superiores a 205 unidades Hs. El primero, también predice PGL cuando esta condición no se satisface, siempre y cuando los niveles de expresión de VMAT2 sean superiores a 97 unidades Hs (Fig. 24 C). El segundo árbol, también predice PGL cuando COXIV2 es superior a 141,5 y NDUFA4L2 es menor a 150 (Fig.24 D), lo cuál indica que emerge una interacción entre estos dos biomarcadores, con valor diagnóstico, de tal forma que PGL es el tipo histológico que se predice cuando NDUFA4L2 se encuentra altamente expresado (más de 205) o cuando COXIV2 está muy expresado (más de 141,5) pero, al mismo tiempo, la expresión de NDUFA4L2 es relativamente moderada (inferior a 150). Respecto al error de predicción de estos dos árboles, muestran un error global del 15,1% y 13,5% respectivamente, aunque cabe remarcar que éste aumenta hasta el 50%, de forma similar para ambos árboles, cuando se procede a calcular el error a partir de una validación interna cruzada.

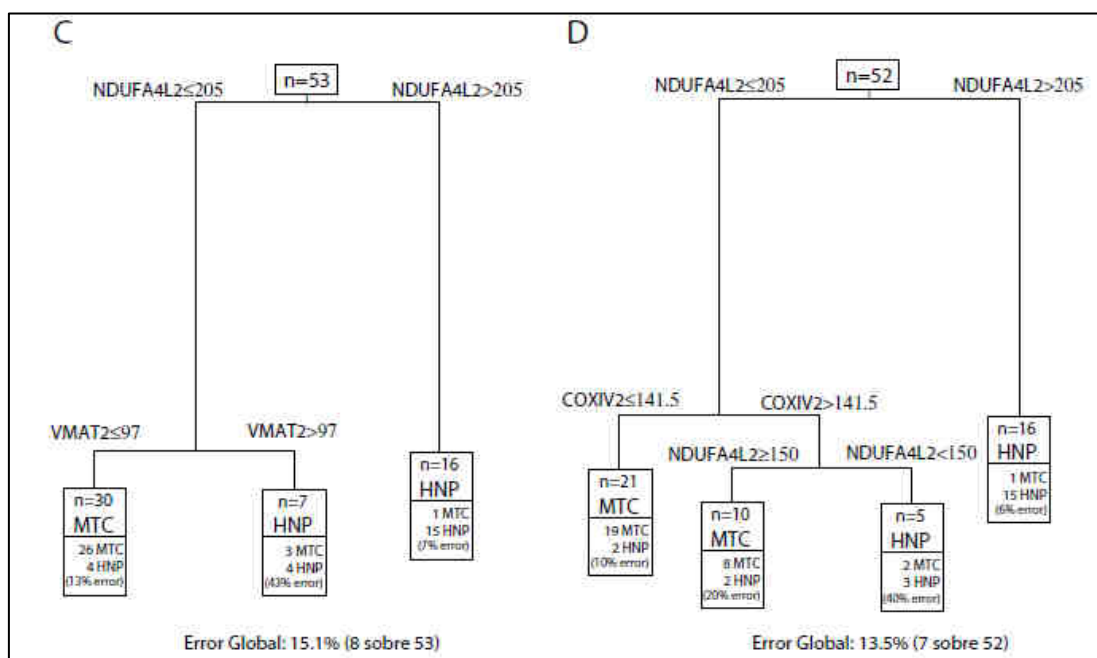


Fig.24 C y D. Árboles con 2 dos predictores.C: NDUFA4L2 y VMAT2; D: NDUFA4L2 y COXIV2.

Para combinar los resultados previos, construimos un clasificador más simple (Tabla XIV), basado en las reglas determinadas por los cuatro árboles previos, de tal forma que se combinaran los niveles de expresión de CGRP/calcitonina con la expresión de NDUFA4L2, VMAT2 y COXIV2, con el objetivo de proporcionar un valor predictivo más informativo, desde el punto de vista biológico. Este clasificador estableció que el tipo histológico corresponde a PGL cuando CGRP se encuentra pobremente expresado ($H_s < 10$), pero unido a niveles de expresión elevados de, al menos, alguno de los biomarcadores siguientes: NDUFA4L2, VMAT2 o COXIV2. Este clasificador muestra un error global del 0%, de tal forma que una tinción pobre de CGRP o de calcitonina ($H_s < 10$ e < 50 respectivamente) junto al resultado positivo de cualquiera de NDUFA4L2, VMAT2 o COXIV2 es suficiente para diagnosticar PGL.

Condición	Predicción
Si({CGRP<10 o CALCITONINA<50} y {NDUFA4L2>205 o VMAT2>97 o COXIV2>141,5})	PGL
Los otros tumores	CMT

Tabla XIV. Regla de clasificación final PGL/CMT.

4.3.3 Evaluación de los 4 casos de PT

Los resultados de la tinción inmunohistoquímica de los 4 paragangliomas tiroideos testados se recogen en la tabla siguiente (tabla XV) comparándolos con los resultados obtenidos en el array de tejidos construido con 24 casos de PGL y el de 30 muestras de CMT.

Anticuerpo	TMA CMT Hs media (rango)	TMA PGL; Hs media (rango)	Caso1 Hs	Caso2 Hs	Caso3 Hs	Caso4 Hs
Anti-NDUFA4L2	149 (100-206)	215 (112-285)	250	195	210	240
Anti-COXIV2	126 (15-165)	154 (101-260)	220	210	250	210
Anti-VMAT2	83 (20-100)	98 (0-130)	170	140	170	170
Anti-CGRP	242 (70-296)	0,97 (0-7,5)	0	0	0	0
Anti-Calcitonina	253 (168-295)	1,7 (0-40)	0	0	0	0
Anti- TTF-1	72 (0-205)	0 (0-0)	0	115	0	0
Anti-CEA	150 (0-2959)	0 (0-0)	0	0	0	0

Tabla XV. Resumen de los principales resultados de la tinción inmunohistoquímica de 7 proteínas en los 2 TMA (CMT y PGL) en los 4 PT.

Todos los casos mostraron una fuerte tinción citoplasmática para NDUFA4L2 (rango de los Hs fue de 195 a 250) y COXIV2 (rango de los Hs fue de 210 a 250). Los cuatro casos presentaron una moderada expresión para VMAT2 (el rango de los Hs fue de 140 a 170). Los tres biomarcadores (NDUFA4L2, VMAT2 y COXIV2) testados en los PT presentaron Hs mayores que los 30 casos de CMT y, entre ellos, se observa el mayor de los Hs valorados, con la excepción de NDUFA4L2 en el caso 2 (Hs en el caso 2 es de 195, el Hs mayor en el CMT es de 206). Además los cuatro casos fueron completamente negativos para CGRP, calcitonina y CEA. Las imágenes representativas de los casos testados se muestran en la fig.25.

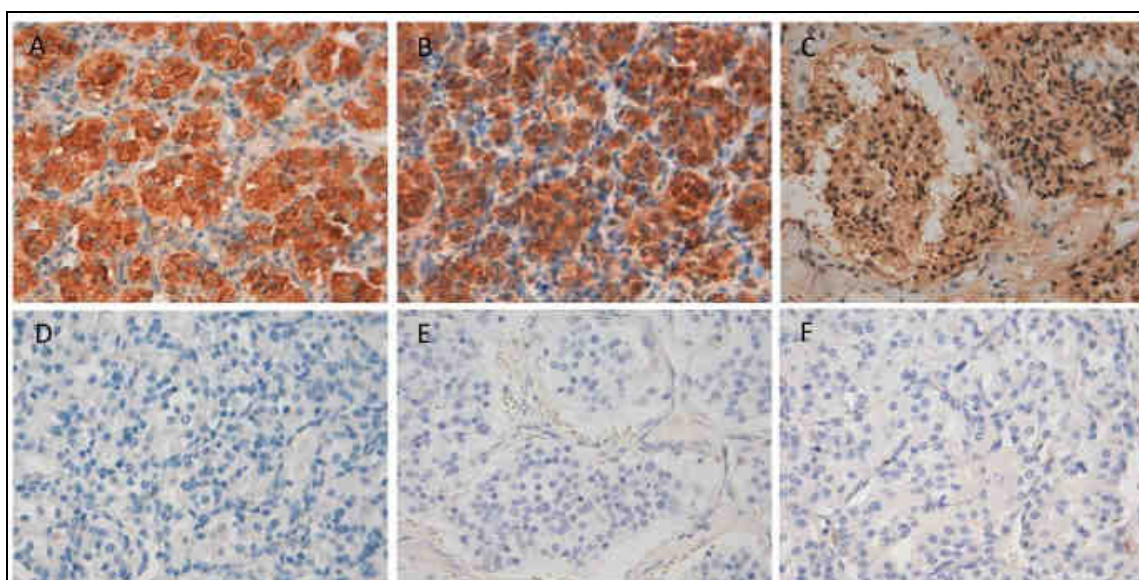


Fig 25: Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica, de los biomarcadores candidatos, en los cuatro paragangliomas tiroideos testados.

(A: tinción citoplasmática positiva de NDUFA4L2, en el caso 3; B: tinción positiva de COXIV2, en el caso 2; C: tinción positiva de VMAT2, en el caso 1; D, tinción negativa de CGRP en el caso 3; E: tinción negativa de CEA, en el caso 4; F: tinción negativa de TTF-1, en el caso 3)

Destaca uno de los casos de PT, el cual presentó expresión nuclear de TTF-1. Esta misma expresión nuclear, en los 24 casos del array de tejidos de los PGL, fue totalmente negativa.

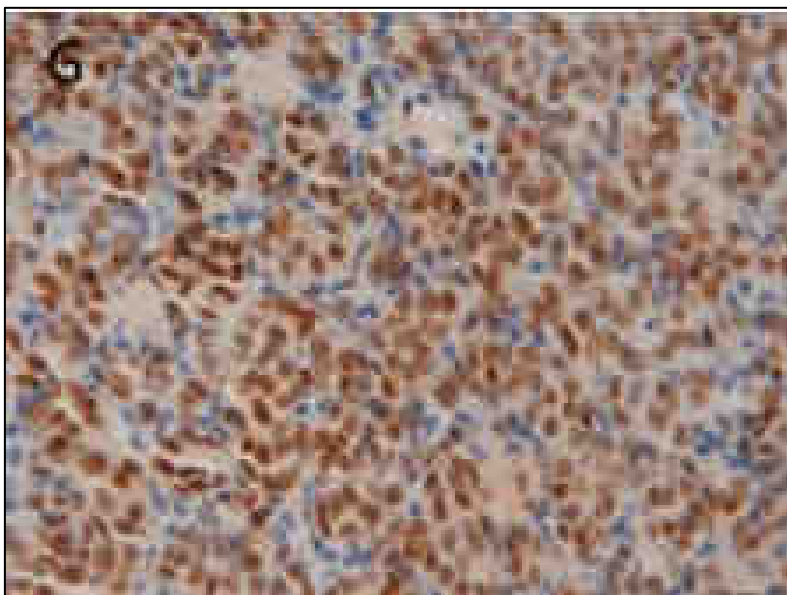


Fig. 25 G: PT (caso 2). Inmunotinción nuclear positiva de TTF-1.

Se realizó una validación externa de la clasificación por medio de árboles usando para este propósito los cuatro casos testados, lo que demostró que todos los casos fueron considerados como PGL por los primeros tres árboles, pero uno de los casos (caso 2 de la tabla) fue incorrectamente valorado como CMT usando el cuarto árbol. Sin embargo, según la regla de clasificación presentada, (tabla XIII) todos los casos fueron considerados como PGL.

5. DISCUSIÓN

El CMT es un tumor maligno de la glándula tiroides que muestra diferenciación de células C, productoras de calcitonina y otros péptidos. Es un tumor agresivo y poco frecuente. El tratamiento de los tumores irresecables o metastásicos es poco eficaz, a pesar de los últimos avances con Vandetinib

El 25% de los CMT son hereditarios y causados por una mutación en la línea germinal del proto-oncogén RET, que se transmite de forma autosómico dominante, dando lugar a tres cuadros clínicos denominados MEN2A, MEN2B y CMTF. Más del 90% de los pacientes con MEN2 son portadores de mutaciones puntuales en el oncogén RET. La mayoría de las mutaciones germinales se han encontrado en los exones 10 y 11. El resto de tumores son esporádicos. La mayoría de las mutaciones somáticas de RET, afectan al exón 16 (Lodish and Stratakis, 2008) Las mutaciones de RET son activadoras y provocan ganancia de función.

La proteína RET es el receptor para los ligandos de la familia GDNF (GFLs), que transmite al interior de la célula las señales extracelulares de un complejo multimolecular (Airaksinen et al., 1999);(Saarma, 2000; Saarma and Sariola, 1999) El dominio intracelular de RET contiene numerosos puntos de autofosforilación y las tirosinas fosforiladas sirven de puntos de anclaje para vías de señales como PCLyRAS/ERK, PI3K/AKT, MAPK y JNK. (Arighi et al., 2005).

NF- κ B/Rel es uno de los genes diana de RET. Se ha relacionado con carcinogénesis por su efecto en la regulación de varios genes relacionados con apoptosis y ciclo celular. Algunos genes diana de NF- κ B como BCL-xL y FLIP pueden inhibir la apoptosis. Otros como ciclina D1 pueden promover la progresión a ciclo celular (Dolcet et al., 2005a).

En el CMT se había descrito la activación de NF- κ B inducida por RET (Ludwig et al., 2001). Los autores demostraron la presencia de p65 activa en el núcleo de la línea celular TT. Asimismo, evidenciaron la correlación entre la tinción nuclear de p65 y el status mutacional de RET. Sin embargo,

solo habían estudiado la subunidad p65, en una muestra pequeña de 16 tumores, constituida por 6 CMTF y 10 CMT esporádicos.

Nosotros hemos valorado la expresión de los cinco miembros de la familia NF- κ B y tres de sus genes diana FLIP, BCL-xL y Ciclina D1, en un grupo final 48 CMT , en los que previamente se habían evaluado las mutaciones de RET (13 familiares y 16 somáticas).

Los resultados de la tinción inmunohistoquímica de la familia de proteínas de NF- κ B, han demostrado claramente que NF- κ B está frecuentemente activo, en el CMT, ya que la gran mayoría de los tumores (47/48) mostraron translocación nuclear de una o más subunidades.

En el estudio, llama la atención que las tres subunidades translocadas con mayor frecuencia, fueron p52, c-rel y p65, sin embargo p50 y Rel B mostraron frecuencias más bajas de tinción nuclear. Este resultado es diferente de los datos observados en otros tipos de carcinoma como, por ejemplo, en líneas celulares de carcinoma de mama (Cogswell et al., 2000) o el carcinoma endometrial (Pallares et al., 2004) en los que la activación de NF- κ B muestra mayor frecuencia de las subunidades p50 y p65, que frecuentemente, coexisten en el mismo tumor. En estos dos últimos tumores, parece indicar una activación de NF- κ B por la vía denominada clásica o canónica, ya que son las dos subunidades que se translocan al núcleo en esta forma de activación. Si embargo, nuestros hallazgos indican que el CMT sigue un patrón de activación de NF- κ B diferente, con predominio de p52, p65 y c REL, posiblemente por la vía alternativa.

El estudio también muestra la expresión de las dianas putativas de NF- κ B como son FLIP, Bcl-xL y ciclina D1. La expresión frecuente de FLIP y Bcl-xL resulta muy interesante. El CMT es un tumor que generalmente muestra un índice mitótico bajo, lo que se contradice con su comportamiento agresivo. Se ha sugerido que la proliferación y la apoptosis pueden estar alteradas en este tumor, debido a la presencia de mecanismos de resistencia a la apoptosis. Si

eso es verdad, tanto FLIP como Bcl-xL, pueden jugar un papel significativo en el desarrollo y progresión, ya que cada uno de ellos participa en el proceso de resistencia a la apoptosis a diferentes niveles. FLIP actúa en el control de la vía extrínseca (factores de muerte) y Bcl-xL interfiere con la vía intrínseca (mitocondrial). La falta de correlación estadística entre FLIP o Ciclina D1, y las mutaciones de RET, puede indicar una regularización previa a su activación mediante vías de señales independientes de RET.

Otro hallazgo a destacar es la mayor expresión de Bcl-xL en los CMT con mutación de RET en el exón 16, estadísticamente significativa ($p=0,002$), en comparación con los casos que mostraban las mutaciones en el 10, 11 o los casos sin mutación. La explicación más razonable es que las mutaciones en el dominio quinasa de RET activan algunas vías de señales, como son las ya mencionadas PI3K y NF- κ B, que se asocian a la expresión de Bcl-xL.

La activación de NF- κ B se ha descrito en otros carcinomas de tiroides, destacando la frecuencia de p65 alta en el carcinoma anaplásico, previamente mencionada, y valores menores en el CPT y en el folicular (Pacífico et al., 2004). Cabe mencionar que los dos tumores con mayor frecuencia son más agresivos.

NF- κ B se ha considerado una posible diana terapéutica (Dolcet et al., 2005a) En los trabajos más recientes con inhibidores selectivos de NF- κ B, en líneas celulares de carcinoma de tiroides avanzado, se ha observado disminución de la proliferación, aumento de la apoptosis y disminución de la invasión (Bauerle et al., 2010).

Por lo tanto, el conocimiento más preciso de los mecanismos de carcinogénesis en el CMT y los estudios posteriores apoyados en él, pueden abrir nuevas vías para el tratamiento de los tumores diseminados o metastásicos.

La mitad de los CMT esporádicos no presentan mutación de RET (Boikos (Boikos and Stratakis, 2008). Se ha demostrado una relación antagónica entre RET y algunas proteínas de la familia Sprouty, que regulan la señalización de la vía GDNF-RET (Basson et al., 2005; Basson et al., 2006; Ishida et al., 2007). En el CMT se han descrito algunas alteraciones moleculares como pérdidas alélicas en Spry1, reducción de la expresión de Spry1 y metilación del promotor del gen. Por otro lado se han descrito pérdidas genómicas en Spry 4 (Ye et al., 2008). Además se ha comprobado que la expresión de Spry1 reduce la proliferación “in vitro”, en la línea celular TT de CMT, y provoca crecimiento tumoral en ratones SCID xenotransplantados (Macia et al., 2012).

En el 2º trabajo de esta tesis hemos demostrado, mediante un estudio inmunohistoquímico, que la delección selectiva de Spry1 causa HCC, en ratones adultos jóvenes, que aumenta con la edad, lo que sugiere un papel importante de Spry1 en el tiroides adulto.

De acuerdo con lo anteriormente mencionado, la HCC hallada en los ratones Spry1KO, no se produce por un defecto del desarrollo en la morfogénesis del tiroides embrionario, sino que, más bien, parece progresar durante la vida postnatal.

La HCC es el precursor del carcinoma medular invasor en los síndromes MEN2 (Wolfe et al., 1973) y se ha observado en los CMT esporádicos (Kaserer et al., 2001). Encontramos que los ratones Spry1KO adultos jóvenes no desarrollaron CMT, tal como debería esperarse de un posible gen supresor tumoral (Macia et al., 2012), pero en su lugar desarrollaron HCC. Una posible explicación para esta observación es que nuestros análisis se ha hecho demasiado pronto, pero el 100% de los ratones Spry1null mueren prematuramente por las complicaciones renales, en los primeros 5 meses de vida (Basson et al., 2005). En concordancia con esta idea, se ha observado que los ratones transgénicos, con mutaciones tan potentes como MEN2A y MEN2B bajo diferentes promotores, desarrollaron CMT en un rango de edad más avanzado comprendido entre 8 y 14 meses o más (Michiels et al., 1997).

Solo ratones con 22 copias de un transgen MEN2A desarrollaron CMT el primer mes de vida con una penetrancia del 50% (Kawai et al., 2000). Es interesante reflejar que hay otro dato opuesto al de los animales transgénicos, los ratones “knock-in”, que expresan la mutación MEN2A o MENB del locus RET, no desarrollaron CMT pero en su lugar mostraron HCC (Smith-Hicks et al., 2000; Yin et al., 2007), lo que sugiere la necesidad de un defecto genético adicional para desarrollar CMT.

Se ha mencionado que la pérdida de expresión de Sprouty parece ser un suceso tardío en la progresión del cáncer, como se ha demostrado en el cáncer de próstata (McKie et al., 2005). Nuestros datos sugieren que las alteraciones de Spry1 podrían ser un suceso inicial (HCC) entre los mecanismos de carcinogénesis del CMT, y una posible explicación para aquellos casos sin mutación de RET.

La última parte de la discusión se refiere al tercer trabajo realizado para facilitar el diagnóstico diferencial de CMT y PT.

El CMT puede confundirse con varios tumores ya mencionados, entre los que destaca el PT. Los paragangliomas son tumores neuroendocrinos de los paraganglios, que pueden observarse en la región de cabeza y cuello. Ocasionalmente se originan en el paraganglio laríngeo inferior, a veces, situado dentro de la cápsula del tiroides. En esos casos, pueden presentarse como una masa localizada dentro de la glándula.

El estudio histológico del PT y del CMT, puede mostrar un aspecto microscópico similar, con patrón de crecimiento organoide o en forma de nidos. Esta imagen es particularmente superponible entre el CMT de patrón paragangliomatoso y el PT.

Los PT muestran tinción inmunohistoquímica positiva para enolasa neuronoespecífica, cromogranina A y sinaptofisina; y negativa para CEA, calcitonina y su receptor CGRP. La falta de especificidad de estos marcadores,

obliga a usar una batería de marcadores inmunohistoquímicos en el diagnóstico diferencial entre PT y CMT. Merece la pena mencionar que se han observado CMT negativos para CEA y calcitonina (Matias-Guiu et al., 2004). Como ya se ha mencionado, los marcadores tradicionalmente usados en el diagnóstico diferencial entre PT y CMT no son específicos (Komminoth et al., 1994 ; Rieu et al., 1995)

En nuestro último estudio, se decidió testar una batería de marcadores inmunohistoquímicos obtenidos tras realizar un estudio comparativo de análisis de arrays de cDNA. Los primeros análisis en 2 arrays de DNA, de CMT y PGL, resaltaron que tres de los transcritos seleccionados se expresan intensamente en el CMT cuando se comparan con los PGL. Son los biomarcadores usados, con mayor frecuencia, en el diagnóstico de CMT (CEA, CGRP/calcitonina y TTF-1). Para completar el estudio, se seleccionaron otros 3 genes por su elevada expresión en PGL (NDUFA4L2, COXIV2 o VMAT2).

Uno de los genes expresados de forma claramente diferenciada en PGL fue COXIV2 (isoforma 2 de la subunidad IV citocromo c oxidasa) (Hüttemann 1994) que pertenece a la familia de la citocromo c oxidasa IV. La citocromo c oxidasa (COX), enzima terminal de la cadena respiratoria mitocondrial, cataliza la transferencia de 1 electrón de la forma reducida del citocromo c, a la forma oxidada. Está formada por un complejo heteromérico de 3 sub-unidades catalíticas codificadas por genes mitocondriales y múltiples subunidades estructurales codificados por genes nucleares. La subunidad IV es la mayor de las codificadas y juega el papel de pivot en la regulación COX.

Otro de los genes específicos de PGL fué NDUFA4L2 que codifica la proteína NADH deshidrogenada subcomplejo alfa ,4-like2, que es homóloga de la deshidrogenada alpha1 subcomplejo 4, una subunidad del complejo mitocondrial I. Aunque la función de esta proteína es desconocida, se postula que puede actuar como un interruptor COX1/COX4-2, limitando la actividad del complejo I en tumores hipóxicos (Hu et al., 2000)

Por último, el tercer gen seleccionado, bastante específico de PGL, fue VMAT2, que codifica el transportador 2 monoamino vesicular. VMAT2 es una proteína de membrana integral que actúa transportando monoaminas, particularmente neurotransmisores como son dopamina, norepinefrina, serotonina e histamina, desde el citosol a las vesículas sinápticas.

El primer transcrito seleccionado por su elevada expresión en los MTC corresponde al gen CGRP/calcitonina, gen complejo que codifica una pequeña familia de péptidos, y que consta de 6 exones. Los tres primeros exones están presentes en el RNA mensajero de ambas proteínas, CGRP y calcitonina, mientras que el exón 4 solo forma parte del transcrito de la calcitonina y el exón 5 solo forma parte del transcrito CGRP. Como CGRP y la calcitonina se producen por “splicing” alternativo del mismo gen, y el procedimiento en microarray no discrimina entre ellos, decidimos testar los anticuerpos frente a las dos proteínas, en el estudio de validación inmunohistoquímica. Vale la pena destacar que los resultados son casi idénticos. El segundo y el tercer transcrito seleccionados en el CMT, fueron CEA y TTF-1, que son marcadores ya conocidos en este tumor. TTF-1 es un homodominio que contiene un factor de transcripción que se expresa en el tiroides, en los pulmones y en algunas áreas del cerebro. La tinción inmunohistoquímica de TTF-1 positiva se ha demostrado en tumores de tiroides, de pulmón (principalmente adenocarcinomas y de células pequeñas) y de otros órganos. Recientemente, TTF-1 se ha observado en pequeñas áreas de otros tumores y ocasionalmente en la mama. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que la expresión de TTF-1 en esos tumores puede depender del anticuerpo usado (Bisceglia et al., 2011).

Hemos validado los 6 genes candidatos en arrays de tejidos constituidos por 30 muestras de CMT y 24 casos de PGL. Los resultados demuestran que CGRP es el mejor marcador en el diagnóstico diferencial ya que, algunas muestras, son negativas para CEA y TTF-1. Por otro lado, comprobamos que los PGL son, positivos muy frecuentemente, para los tres marcadores: NDUFA4L2, COXIV2 y VMAT2.

Hemos propuesto cuatro árboles de clasificación, dos de los cuales evalúan exclusivamente CGRP (Hs<10) o calcitonina (Hs<50). Los otros dos usan los marcadores NDUFA4L2, COXIV2 y VMAT2. Además, hemos propuesto una regla clasificadora final, que combina CGRP, como marcador de CMT, con los tres marcadores de PGL estudiados que mostraron un error del 0% en la clasificación interna.

Por último, testamos los biomarcadores mencionados en los 4 ejemplos de PT. Todos los casos fueron positivos para los tres marcadores de PGL propuestos, con mayor intensidad de tinción de NDUFA4L2, COXIV2 al compararlos con VMAT2. Los resultados resaltan la importancia de estos marcadores en el diagnóstico diferencial. Los 4 casos han sido negativos en la tinción de CGRP y CEA, pero uno de ellos muestra tinción nuclear positiva de TTF-1, un dato que no se había publicado previamente en paragangliomás. Por eso, una combinación negativa de CGRP y el resultado positivo para cualquiera de los tres marcadores de paraganglioma, confirma el diagnóstico de PT.

La evaluación aislada de CGRP parece específica en este diagnóstico diferencial ya que tanto los PGL como los PT fueron negativos casi siempre o débilmente positivos (<Hs10) para este marcador. Sin embargo, la combinación de CGRP con cualquiera de las tres proteínas expresadas en los paragangliomás (NDUFA4L2, COXIV2 y VMAT2) proporciona información adicional, que permite confirmar la naturaleza del tumor.

La batería propuesta puede ser útil para resolver problemás de diagnóstico diferencial entre CMT y PT en las piezas de tiroidectomía, pero sobre todo, cuando la muestra es más escasa como sucede en las biopsias con aguja gruesa (BAG) y los bloques celulares obtenidos en la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) de un nódulo tiroideo. Merece la pena destacar que el diagnóstico correcto en este material, permitirá elegir el tipo de tratamiento adecuado y limitar las posibles complicaciones postquirúrgicas.

El caso 2 de nuestra serie muestra peculiaridades destacables. El diagnóstico histopatológico original fue PT y el tumor mostró tinción positiva con TTF-1. Sin embargo, la aplicación de la regla clasificadora final, propuesta en este estudio, demostró que el tumor era un PT, como apuntaba la morfología. La tinción positiva de TTF-1 puede explicarse como un hallazgo, similar a los casos descritos en mama y otros órganos (Bisceglia et al., 2011).

Los últimos PT publicados no hacen referencia al uso de la batería de diagnóstico diferencial propuesta (Evankovich et al., 2012 ; Zakkar and Hunt, 2013), tal vez porque ninguno de ellos se ha diagnosticado previamente a la cirugía.

Queremos comentar nuestra escasa experiencia en 2 casos con dificultades diagnósticas. Destacamos su valor en un nuevo caso de PT (no publicado), en el que la batería propuesta facilitó el diagnóstico y el segundo caso permitió descartar PT en un coágulo de PAAF de un tumor tiroideo de morfología indeterminada, completamente negativo para calcitonina, que posteriormente la pieza quirúrgica confirmó como un CMT con tinción de calcitonina muy irregular y negativa en extensas áreas.

6. CONCLUSIONES

- 1.- NF- κ B está frecuentemente activo, en el CMT, ya que la gran mayoría de los tumores (47/48) mostraron translocación nuclear de una o más subunidades de esta familia de proteínas.
- 2.- Las tres subunidades que mostraron mayor frecuencia de translocación nuclear fueron p52, c-rel y p65.
- 3.- El CMT sigue un patrón de activación por la “vía alternativa” de NF- κ B (predominio de p52, p65 y REL B).
- 4.-La señalización de RET es la responsable de la activación de NF- κ B, pero también puede activarse por otras vías de señales independientes de RET.
- 5.- La expresión de Bcl-xL es mayor y, estadísticamente significativa ($p=0.002$), en los tumores con mutación en el exón 16 de RET, en comparación la expresión observada en los tumores con mutaciones en los exónes 10 y 11, o en los no mutados.
- 6.- La delección selectiva de Spry1 causa HCC en ratones adultos jóvenes.
- 7.- Hay diferencias significativas en el número de células C entre los ratones Spry1KO y los ratones Spry1WT/H de la misma edad (a las tres semanas de vida).

8.- Las células C aumentan con la edad, pero el aumento no es proporcional a la edad del ratón.

9.- El incremento del número de células C en los ratones Spry1KO se debe a una proliferación de células C en animales adultos, más que a un defecto del desarrollo.

10.- Una combinación negativa de CGRP y positiva para cualquiera de los tres marcadores de paraganglioma: NDUFA4L2, VMAT2 y COXIV2, confirma el diagnóstico de PT.

7.BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal, B.B., Takada, Y., Shishodia, S., Gutierrez, A.M., Oommen, O.V., Ichikawa, H., Baba, Y., and Kumar, A. (2004). Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine. *Indian J Exp Biol* 42, 341-353.
- Airaksinen, M.S., and Saarma, M. (2002a). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3, 383-394.
- Airaksinen, M.S., and Saarma, M. (2002b). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3, 383-394.
- Airaksinen, M.S., Titievsky, A., and Saarma, M. (1999). GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 13, 313-325.
- Al-Rawi, M., and Wheeler, M.H. (2006). Medullary thyroid carcinoma--update and present management controversies. *Ann R Coll Surg Engl* 88, 433-438.
- Alberti, L., Borrello, M.G., Ghizzoni, S., Torriti, F., Rizzetti, M.G., and Pierotti, M.A. (1998). Grb2 binding to the different isoforms of Ret tyrosine kinase. *Oncogene* 17, 1079-1087.
- Albores-Saavedra, J.A., and Krueger, J.E. (2001). C-cell hyperplasia and medullary thyroid microcarcinoma. *Endocr Pathol* 12, 365-377.
- Andreozzi, F., Melillo, R.M., Carlomagno, F., Oriente, F., Miele, C., Fiory, F., Santopietro, S., Castellone, M.D., Beguinot, F., Santoro, M., *et al.* (2003). Protein kinase Calpha activation by RET: evidence for a negative feedback mechanism controlling RET tyrosine kinase. *Oncogene* 22, 2942-2949.
- Aranda, S., Alvarez, M., Turro, S., Laguna, A., and de la Luna, S. (2008). Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. *Mol Cell Biol* 28, 5899-5911.
- Arighi, E., Alberti, L., Torriti, F., Ghizzoni, S., Rizzetti, M.G., Pelicci, G., Pasini, B., Bongarzone, I., Piutti, C., Pierotti, M.A., *et al.* (1997). Identification of Shc docking site on Ret tyrosine kinase. *Oncogene* 14, 773-782.
- Arighi, E., Borrello, M.G., and Sariola, H. (2005). RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 441-467.
- Armstrong, M.J., Chiosea, S.I., Carty, S.E., Hodak, S.P., and Yip, L. (2012). Thyroid paragangliomas are locally aggressive. *Thyroid* 22, 88-93.
- Asai, N., Iwashita, T., Matsuyama, M., and Takahashi, M. (1995). Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. *Mol Cell Biol* 15, 1613-1619.
- Asai, N., Jijiwa, M., Enomoto, A., Kawai, K., Maeda, K., Ichihara, M., Murakumo, Y., and Takahashi, M. (2006). RET receptor signaling: dysfunction in thyroid cancer and Hirschsprung's disease. *Pathol Int* 56, 164-172.
- Asai, N., Murakami, H., Iwashita, T., and Takahashi, M. (1996). A mutation at tyrosine 1062 in MEN2A-Ret and MEN2B-Ret impairs their transforming activity and association with shc adaptor proteins. *J Biol Chem* 271, 17644-17649.
- Ashraf, M.J., Azarpira, N., Vasei, M., Tavakol, M.H., and Khademi, B. (2008). Thyroid paraganglioma: diagnostic pitfall in fine needle aspiration biopsy. *Acta Cytol* 52, 745-747.
- Avruch, J., Zhang, X.F., and Kyriakis, J.M. (1994). Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* 19, 279-283.
- Barnier, J.V., Papin, C., Eyche, A., Lecoq, O., and Calothy, G. (1995). The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J Biol Chem* 270, 23381-23389.
- Basson, M.A., Akbulut, S., Watson-Johnson, J., Simon, R., Carroll, T.J., Shakya, R., Gross, I., Martin, G.R., Lufkin, T., McMahon, A.P., *et al.* (2005). Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. *Dev Cell* 8, 229-239.
- Basson, M.A., Watson-Johnson, J., Shakya, R., Akbulut, S., Hyink, D., Costantini, F.D., Wilson, P.D., Mason, I.J., and Licht, J.D. (2006). Branching morphogenesis of the ureteric epithelium during kidney development is coordinated by the opposing functions of GDNF and Sprouty1. *Dev Biol* 299, 466-477.
- Baud, V., and Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11, 372-377.

- Bauerle, K.T., Schweppe, R.E., and Haugen, B.R. (2010). Inhibition of nuclear factor-kappa B differentially affects thyroid cancer cell growth, apoptosis, and invasion. *Mol Cancer* 9, 117.
- Bisceglia, M., Galliani, C., and Rosai, J. (2011). TTF-1 expression in breast carcinoma-the chosen clone matters. In *Am J Surg Pathol* (United States), pp. 1087-1088.
- Boedeker, C.C., Hensen, E.F., Neumann, H.P., Maier, W., van Nederveen, F.H., Suarez, C., Kunst, H.P., Rodrigo, J.P., R, P.T., Pellitteri, P.K., *et al.* (2013). Genetics of hereditary head and neck paragangliomas. *Head Neck*.
- Boikos, S.A., and Stratakis, C.A. (2008). Molecular mechanisms of medullary thyroid carcinoma: current approaches in diagnosis and treatment. *Histol Histopathol* 23, 109-116.
- Borrello, M.G., Alberti, L., Arighi, E., Bongarzone, I., Battistini, C., Bardelli, A., Pasini, B., Piutti, C., Rizzetti, M.G., Mondellini, P., *et al.* (1996). The full oncogenic activity of Ret/ptc2 depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase Cgamma. *Mol Cell Biol* 16, 2151-2163.
- Brandi, M.L., Gagel, R.F., Angeli, A., Bilezikian, J.P., Beck-Peccoz, P., Bordi, C., Conte-Devolx, B., Falchetti, A., Gheri, R.G., Libroia, A., *et al.* (2001). Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5658-5671.
- Brauckhoff, M., Gimm, O., Weiss, C.L., Ukkat, J., Sekulla, C., Brauckhoff, K., Thanh, P.N., and Dralle, H. (2004). Multiple endocrine neoplasia 2B syndrome due to codon 918 mutation: clinical manifestation and course in early and late onset disease. *World J Surg* 28, 1305-1311.
- Bui, N.T., Livolsi, A., Peyron, J.F., and Prehn, J.H. (2001). Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha. *J Cell Biol* 152, 753-764.
- Burke, B.A., Johnson, D., Gilbert, E.F., Drut, R.M., Ludwig, J., and Wick, M.R. (1987). Thyrocalcitonin-containing cells in the Di George anomaly. *Hum Pathol* 18, 355-360.
- Burnichon, N., Briere, J.J., Libe, R., Vescovo, L., Riviere, J., Tissier, F., Jouanno, E., Jeunemaitre, X., Benit, P., Tzagoloff, A., *et al.* (2010). SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet* 19, 3011-3020.
- Bussolati, G., Foster, G.V., Clark, M.B., and Pearse, A.G. (1969). Immunofluorescent localisation of calcitonin in medullary C-cell thyroid carcinoma, using antibody to the pure porcine hormone. *Virchows Arch B Cell Pathol* 2, 234-238.
- Carlson, K.M., Dou, S., Chi, D., Scavarda, N., Toshima, K., Jackson, C.E., Wells, S.A., Jr., Goodfellow, P.J., and Donis-Keller, H. (1994). Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1579-1583.
- Carter, M.T., Yome, J.L., Marcil, M.N., Martin, C.A., Vanhorne, J.B., and Mulligan, L.M. (2001). Conservation of RET proto-oncogene splicing variants and implications for RET isoform function. *Cytogenet Cell Genet* 95, 169-176.
- Cayot, F., Bastien, H., Justrabo, E., Mottot, C., Cuisenier, J., Bruchon, Y., and Cabanne, F. (1982). [Multiple paragangliomas of the neck localized in the thyroid region. Papillary thyroid cancer associated with parathyroid adenoma]. *Sem Hop* 58, 2004-2007.
- Cerrato, A., De Falco, V., and Santoro, M. (2009). Molecular genetics of medullary thyroid carcinoma: the quest for novel therapeutic targets. *J Mol Endocrinol* 43, 143-155.
- Chappuis-Flament, S., Pasini, A., De Vita, G., Segouffin-Cariou, C., Fusco, A., Attie, T., Lenoir, G.M., Santoro, M., and Billaud, M. (1998). Dual effect on the RET receptor of MEN 2 mutations affecting specific extracytoplasmic cysteines. *Oncogene* 17, 2851-2861.
- Chiariello, M., Visconti, R., Carlomagno, F., Melillo, R.M., Bucci, C., de Franciscis, V., Fox, G.M., Jing, S., Coso, O.A., Gutkind, J.S., *et al.* (1998). Signalling of the Ret receptor tyrosine kinase through the c-Jun NH2-terminal protein kinases (JNKs): evidence for a divergence of the ERKs and JNKs pathways induced by Ret. *Oncogene* 16, 2435-2445.

- Choi, C., Jeong, E., and Benveniste, E.N. (2004). Caspase-1 mediates Fas-induced apoptosis and is up-regulated by interferon-gamma in human astrocytoma cells. *J Neurooncol* 67, 167-176.
- Christofori, G. (2003). Split personalities: the agonistic antagonist Sprouty. *Nat Cell Biol* 5, 377-379.
- Chu, Z.L., McKinsey, T.A., Liu, L., Gentry, J.J., Malim, M.H., and Ballard, D.W. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10057-10062.
- Ciampi, R., and Nikiforov, Y.E. (2005). Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 16, 163-172.
- Cogswell, P.C., Guttridge, D.C., Funkhouser, W.K., and Baldwin, A.S., Jr. (2000). Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* 19, 1123-1131.
- Costinean, S., Balatti, V., Bottoni, A., Old, M., Croce, C., and Wakely, P.E., Jr. (2012). Primary intrathyroidal paraganglioma: histopathology and novel molecular alterations. *Hum Pathol* 43, 2371-2375.
- Coulpier, M., Anders, J., and Ibanez, C.F. (2002). Coordinated activation of autophosphorylation sites in the RET receptor tyrosine kinase: importance of tyrosine 1062 for GDNF mediated neuronal differentiation and survival. *J Biol Chem* 277, 1991-1999.
- Crowder, R.J., Enomoto, H., Yang, M., Johnson, E.M., Jr., and Milbrandt, J. (2004). Dok-6, a Novel p62 Dok family member, promotes Ret-mediated neurite outgrowth. *J Biol Chem* 279, 42072-42081.
- Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.
- DeLellis, R.A. (1995). Multiple endocrine neoplasia syndromes revisited. Clinical, morphologic, and molecular features. *Lab Invest* 72, 494-505.
- Deshpande, H.A., Sheth, K., Sosa, J.A., and Roman, S. (2012). Efficacy and tolerability of pharmacotherapy options for the treatment of medullary thyroid cancer. *Clin Med Insights Oncol* 6, 355-362.
- Deveraux, Q.L., Leo, E., Stennicke, H.R., Welsh, K., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo j* 18, 5242-5251.
- Diaz-Cano, S.J., de Miguel, M., Blanes, A., Tashjian, R., and Wolfe, H.J. (2001). Germline RET 634 mutation positive MEN 2A-related C-cell hyperplasias have genetic features consistent with intraepithelial neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 3948-3957.
- Dibb, N.J., Dilworth, S.M., and Mol, C.D. (2004). Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. *Nat Rev Cancer* 4, 718-727.
- Divgi, C. (2011). Targeted systemic radiotherapy of pheochromocytoma and medullary thyroid cancer. *Semin Nucl Med* 41, 369-373.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., and Matias-Guiu, X. (2005a). NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 446, 475-482.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., Rue, M., Comella, J.X., and Matias-Guiu, X. (2005b). FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Lab Invest* 85, 885-894.
- Dominguez-Malagon, H., Delgado-Chavez, R., Torres-Najera, M., Gould, E., and Albores-Saavedra, J. (1989). Oxyphil and squamous variants of medullary thyroid carcinoma. *Cancer* 63, 1183-1188.
- Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K.M., Toshima, K., Lairmore, T.C., Howe, J.R., Moley, J.F., Goodfellow, P., and Wells, S.A., Jr. (1993). Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 2, 851-856.
- Douwes Dekker, P.B., Hogendoorn, P.C., Kuipers-Dijkshoorn, N., Prins, F.A., van Duinen, S.G., Taschner, P.E., van der Mey, A.G., and Cornelisse, C.J. (2003). SDHD mutations in head and neck paragangliomas result in destabilization of complex II in the

- mitochondrial respiratory chain with loss of enzymatic activity and abnormal mitochondrial morphology. *J Pathol* 201, 480-486.
- Dralle, H., Gimm, O., Simon, D., Frank-Raue, K., Gortz, G., Niederle, B., Wahl, R.A., Koch, B., Walgenbach, S., Hampel, R., *et al.* (1998). Prophylactic thyroidectomy in 75 children and adolescents with hereditary medullary thyroid carcinoma: German and Austrian experience. *World J Surg* 22, 744-750; discussion 750-741.
- Durick, K., Wu, R.Y., Gill, G.N., and Taylor, S.S. (1996). Mitogenic signaling by Ret/ptc2 requires association with enigma via a LIM domain. *J Biol Chem* 271, 12691-12694.
- Dvorakova, S., Vaclavikova, E., Sykorova, V., Vcelak, J., Novak, Z., Duskova, J., Ryska, A., Laco, J., Cap, J., Kodetova, D., *et al.* (2008). Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol* 284, 21-27.
- Elisei, R., Cosci, B., Romei, C., Bottici, V., Renzini, G., Molinaro, E., Agate, L., Vivaldi, A., Faviana, P., Basolo, F., *et al.* (2008). Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 682-687.
- Elisei, R., Romei, C., Cosci, B., Agate, L., Bottici, V., Molinaro, E., Sculli, M., Miccoli, P., Basolo, F., Grasso, L., *et al.* (2007). RET genetic screening in patients with medullary thyroid cancer and their relatives: experience with 807 individuals at one center. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 4725-4729.
- Encinas, M., Crowder, R.J., Milbrandt, J., and Johnson, E.M., Jr. (2004). Tyrosine 981, a novel ret autophosphorylation site, binds c-Src to mediate neuronal survival. *J Biol Chem* 279, 18262-18269.
- Eng, C., Kiuru, M., Fernandez, M.J., and Aaltonen, L.A. (2003). A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat Rev Cancer* 3, 193-202.
- Erovic, B.M., Kim, D., Cassol, C., Goldstein, D.P., Irish, J.C., Asa, S.L., and Mete, O. (2012). Prognostic and predictive markers in medullary thyroid carcinoma. *Endocr Pathol* 23, 232-242.
- Eusebi, V., Damiani, S., Riva, C., Lloyd, R.V., and Capella, C. (1990). Calcitonin free oat-cell carcinoma of the thyroid gland. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 417, 267-271.
- Evankovich, J., Dedhia, R.C., Bastaki, J.M., Tublin, M., and Johnson, J.T. (2012). Primary sclerosing paraganglioma of the thyroid gland: a case report. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 121, 510-515.
- Farndon, J.R., Leight, G.S., Dilley, W.G., Baylin, S.B., Smallridge, R.C., Harrison, T.S., and Wells, S.A., Jr. (1986). Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *Br J Surg* 73, 278-281.
- Ferri, E., Manconi, R., Armato, E., and Ianniello, F. (2009). Primary paraganglioma of thyroid gland: a clinicopathologic and immunohistochemical study with review of the literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 29, 97-102.
- Figlioli, G., Landi, S., Romei, C., Elisei, R., and Gemignani, F. (2013). Medullary thyroid carcinoma (MTC) and RET proto-oncogene: mutation spectrum in the familial cases and a meta-analysis of studies on the sporadic form. *Mutat Res* 752, 36-44.
- Fink, M., Weinhusel, A., Niederle, B., and Haas, O.A. (1996). Distinction between sporadic and hereditary medullary thyroid carcinoma (MTC) by mutation analysis of the RET proto-oncogene. "Study Group Multiple Endocrine Neoplasia Austria (SMENA)". *Int J Cancer* 69, 312-316.
- Fong, C.W., Chua, M.S., McKie, A.B., Ling, S.H., Máson, V., Li, R., Yusoff, P., Lo, T.L., Leung, H.Y., So, S.K., *et al.* (2006). Sprouty 2, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 66, 2048-2058.
- Frank, M.J., Dawson, D.W., Bensinger, S.J., Hong, J.S., Knosp, W.M., Xu, L., Balatoni, C.E., Allen, E.L., Shen, R.R., Bar-Sagi, D., *et al.* (2009). Expression of sprouty2 inhibits B-cell proliferation and is epigenetically silenced in mouse and human B-cell lymphomas. *Blood* 113, 2478-2487.
- Fusco, A., Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M.T., Pilotti, S., Pierotti, M.A., Della Porta, G., and Vecchio, G. (1987). A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature* 328, 170-172.

- Geske, F.J., and Gerschenson, L.E. (2001). The biology of apoptosis. *Hum Pathol* 32, 1029-1038.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl, S81-96.
- Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-260.
- Gild, M.L., Landa, I., Ryder, M., Ghossein, R.A., Knauf, J.A., and Fagin, J.A. (2013). Targeting mTOR in RET mutant medullary and differentiated thyroid cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 20, 659-667.
- Gimm, O., Marsh, D.J., Andrew, S.D., Frilling, A., Dahia, P.L., Mulligan, L.M., Zajac, J.D., Robinson, B.G., and Eng, C. (1997). Germline dinucleotide mutation in codon 883 of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B without codon 918 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3902-3904.
- Gimm, O., Neuberg, D.S., Marsh, D.J., Dahia, P.L., Hoang-Vu, C., Raue, F., Hinze, R., Dralle, H., and Eng, C. (1999). Over-representation of a germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. *Oncogene* 18, 1369-1373.
- Gonzalez Poggioli, N., Lopez Amado, M., and Pimentel, M.T. (2009). Paraganglioma of the thyroid gland: a rare entity. *Endocr Pathol* 20, 62-65.
- Goutas, N., Vlachodimitropoulos, D., Bouka, M., Lazaris, A.C., Nasioulas, G., and Gazouli, M. (2008). BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort. *Anticancer Res* 28, 305-308.
- Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C., and Hickman, J.A. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 144, 903-914.
- Gross, I., Bassit, B., Benezra, M., and Licht, J.D. (2001). Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J Biol Chem* 276, 46460-46468.
- Gujral, T.S., van Veelen, W., Richardson, D.S., Myers, S.M., Meens, J.A., Acton, D.S., Dunach, M., Elliott, B.E., Hoppener, J.W., and Mulligan, L.M. (2008). A novel RET kinase-beta-catenin signaling pathway contributes to tumorigenesis in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 68, 1338-1346.
- Guyetant, S., Dupre, F., Bigorgne, J.C., Franc, B., Dutrieux-Berger, N., Lecomte-Houcke, M., Patey, M., Caillou, B., Viennet, G., Guerin, O., *et al.* (1999). Medullary thyroid microcarcinoma: a clinicopathologic retrospective study of 38 patients with no prior familial disease. *Hum Pathol* 30, 957-963.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y., and Krasnow, M.A. (1998). sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 92, 253-263.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4, 850-858.
- Hansford, J.R., and Mulligan, L.M. (2000). Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 37, 817-827.
- Harach, H.R., and Bergholm, U. (1988). Medullary (C cell) carcinoma of the thyroid with features of follicular oxyphilic cell tumours. *Histopathology* 13, 645-656.
- Harach, H.R., and Bergholm, U. (1992). Small cell variant of medullary carcinoma of the thyroid with neuroblastoma-like features. *Histopathology* 21, 378-380.
- Harach, H.R., and Bergholm, U. (1993). Medullary carcinoma of the thyroid with carcinoid-like features. *J. Clin Pathol* 46: 113-117
- Hayashi, H., Ichihara, M., Iwashita, T., Murakami, H., Shimono, Y., Kawai, K., Kurokawa, K., Murakumo, Y., Imai, T., Funahashi, H., *et al.* (2000). Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oncogene* 19, 4469-4475.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362.

- Hazard JB, Hawk WA, Crile G jr(1959). Medullary (solid) carcinoma of the thyroid; a clinicopathologic entity. *J Clin Endocrinol Metab* 19, 152-157.
- Hazard, J.B. (1977). The C cells (parafollicular cells) of the thyroid gland and medullary thyroid carcinoma. A review. *Am J Pathol* 88, 213-250.
- Hennige, A.M., Lammers, R., Arlt, D., Hoppner, W., Strack, V., Niederfellner, G., Seif, F.J., Haring, H.U., and Kellerer, M. (2000). Ret oncogene signal transduction via a IRS-2/PI 3-kinase/PKB and a SHC/Grb-2 dependent pathway: possible implication for transforming activity in NIH3T3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 167, 69-76.
- Heshmati, H.M., Gharib, H., van Heerden, J.A., and Sizemore, G.W. (1997). Advances and controversies in the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. *Am J Med* 103, 60-69.
- Hijazi, Y.M., Nieman, L.K., and Medeiros, L.J. (1992). Medullary carcinoma of the thyroid as a cause of Cushing's syndrome: a case with ectopic adrenocorticotropin secretion characterized by double enzyme immunostaining. *Hum Pathol* 23, 592-596.
- Hu, R.M., Han, Z.G., Song, H.D., Peng, Y.D., Huang, Q.H., Ren, S.X., Gu, Y.J., Huang, C.H., Li, Y.B., Jiang, C.L., *et al.* (2000). Gene expression profiling in the human hypothalamus-pituitary-adrenal axis and full-length cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9543-9548.
- Huang, S.C., Torres-Cruz, J., Pack, S.D., Koch, C.A., Vortmeyer, A.O., Mannan, P., Lubensky, I.A., Gagel, R.F., and Zhuang, Z. (2003). Amplification and overexpression of mutant RET in multiple endocrine neoplasia type 2-associated medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 459-463.
- Hughes, J.H., El-Mofty, S., Sessions, D., and Liapis, H. (1997). Primary intrathyroidal paraganglioma with metachronous carotid body tumor: report of a case and review of the literature. *Pathol Res Pract* 193, 791-796; discussion 797-799.
- Iavarone, C., Acunzo, M., Carlomagno, F., Catania, A., Melillo, R.M., Carlomagno, S.M., Santoro, M., and Chiariello, M. (2006). Activation of the Erk8 mitogen-activated protein (MAP) kinase by RET/PTC3, a constitutively active form of the RET proto-oncogene. *J Biol Chem* 281, 10567-10576.
- Ichikawa, I., Kuwayama, F., Pope, J.C.t., Stephens, F.D., and Miyazaki, Y. (2002). Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT. *Kidney Int* 61, 889-898.
- Iervolino, A., Iuliano, R., Trapasso, F., Viglietto, G., Melillo, R.M., Carlomagno, F., Santoro, M., and Fusco, A. (2006). The receptor-type protein tyrosine phosphatase J antagonizes the biochemical and biological effects of RET-derived oncoproteins. *Cancer Res* 66, 6280-6287.
- Ikeda, T., Satoh, M., Azuma, K., Sawada, N., and Mori, M. (1998). Medullary thyroid carcinoma with a paraganglioma-like pattern and melanin production: a case report with ultrastructural and immunohistochemical studies. *Arch Pathol Lab Med* 122, 555-558.
- Impagnatiello, M.A., Weitzer, S., Gannon, G., Compagni, A., Cotten, M., and Christofori, G. (2001). Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. *J Cell Biol* 152, 1087-1098.
- Inta, I., Paxian, S., Maeglele, I., Zhang, W., Pizzi, M., Spano, P., Sarnico, I., Muhammad, S., Herrmann, O., Inta, D., *et al.* (2006). Bim and Noxa are candidates to mediate the deleterious effect of the NF-kappa B subunit RelA in cerebral ischemia. *J Neurosci* 26, 12896-12903.
- Ishida, M., Ichihara, M., Mii, S., Jijiwa, M., Asai, N., Enomoto, A., Kato, T., Majima, A., Ping, J., Murakumo, Y., *et al.* (2007). Sprouty2 regulates growth and differentiation of human neuroblastoma cells through RET tyrosine kinase. *Cancer Sci* 98, 815-821.
- Ishizaka, Y., Itoh, F., Tahira, T., Ikeda, I., Sugimura, T., Tucker, J., Fertitta, A., Carrano, A.V., and Nagao, M. (1989). Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene* 4, 1519-1521.

- Iwamoto, T., Taniguchi, M., Asai, N., Ohkusu, K., Nakashima, I., and Takahashi, M. (1993). cDNA cloning of mouse ret proto-oncogene and its sequence similarity to the cadherin superfamily. *Oncogene* 8, 1087-1091.
- Jin, N., Jiang, T., Rosen, D.M., Nelkin, B.D. and Ball D.W. (2009). Dual inhibition of mitogen-activated protein kinase and mammalian target of rapamycin in differentiated and anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 10, 4107-12
- Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P.L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., *et al.* (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85, 1113-1124.
- Johnston, D., Hatzis, D., and Sunday, M.E. (1998). Expression of v-Ha-ras driven by the calcitonin/calcitonin gene-related peptide promoter: a novel transgenic murine model for medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* 16, 167-177.
- Kane, L.A., Tsai, M.S., Gharib, H., Khosla, S., Robertson, D.M., Schaid, D.J., Honchel, R., and Thibodeau, S.N. (1995). Familial medullary thyroid cancer and prominent corneal nerves: clinical and genetic analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 289-293.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.
- Kaserer, K., Scheuba, C., Neuhold, N., Weinhausel, A., Haas, O.A., Vierhapper, H., and Niederle, B. (2001). Sporadic versus familial medullary thyroid microcarcinoma: a histopathologic study of 50 consecutive patients. *Am J Surg Pathol* 25, 1245-1251.
- Kawai, K., Iwashita, T., Murakami, H., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Kusakabe, M., Ono, K., Iida, K., Nakayama, A., and Takahashi, M. (2000). Tissue-specific carcinogenesis in transgenic mice expressing the RET proto-oncogene with a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Cancer Res* 60, 5254-5260.
- Kerr, J.F. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182, 471-474.
- Kim, R. (2005). Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 336-343.
- Kimura, E.T., Nikiforova, M.N., Zhu, Z., Knauf, J.A., Nikiforov, Y.E., and Fagin, J.A. (2003). High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63, 1454-1457.
- Komminoth, P., Kunz, E.K., Matias-Guiu, X., Hiort, O., Christiansen, G., Colomer, A., Roth, J., and Heitz, P.U. (1995). Analysis of RET protooncogene point mutations distinguishes heritable from nonheritable medullary thyroid carcinomas. *Cancer* 76, 479-489.
- Komminoth, P., Roth, J., Saremlani, P., Matias-Guiu, X., Wolfe, H.J., and Heitz, P.U. (1994). Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule in the human thyroid: a marker for medullary thyroid carcinoma and primary C-cell hyperplasia. An immunohistochemical study on 79 thyroid lesions. *Am J Surg Pathol* 18, 399-411.
- Kouvaraki, M.A., Liakou, C., Paraschi, A., Dimás, K., Patsouris, E., Tseleni-Balafouta, S., Rassidakis, G.Z., and Moraitis, D. (2011). Activation of mTOR signaling in medullary and aggressive papillary thyroid carcinomas. *Surgery* 150, 1258-1265.
- Kouvaraki, M.A., Shapiro, S.E., Perrier, N.D., Cote, G.J., Gagel, R.F., Hoff, A.O., Sherman, S.I., Lee, J.E., and Evans, D.B. (2005). RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid* 15, 531-544.
- Kurokawa, K., Iwashita, T., Murakami, H., Hayashi, H., Kawai, K., and Takahashi, M. (2001). Identification of SNT/FRS2 docking site on RET receptor tyrosine kinase and its role for signal transduction. *Oncogene* 20, 1929-1938.
- Kurokawa, K., Kawai, K., Hashimoto, M., Ito, Y., and Takahashi, M. (2003). Cell signalling and gene expression mediated by RET tyrosine kinase. *J Intern Med* 253, 627-633.
- Kwabi-Addo, B., Wang, J., Erdem, H., Vaid, A., Castro, P., Ayala, G., and Ittmann, M. (2004). The expression of Sprouty1, an inhibitor of fibroblast growth factor signal transduction, is decreased in human prostate cancer. *Cancer Res* 64, 4728-4735.

- LaGuette, J., Matias-Guiu, X., and Rosai, J. (1997). Thyroid paraganglioma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of three cases. *Am J Surg Pathol* 21, 748-753.
- Landon, G., and Ordonez, N.G. (1985). Clear cell variant of medullary carcinoma of the thyroid. *Hum Pathol* 16, 844-847.
- Lao, D.H., Yusoff, P., Chandramouli, S., Philp, R.J., Fong, C.W., Jackson, R.A., Saw, T.Y., Yu, C.Y., and Guy, G.R. (2007). Direct binding of PP2A to Sprouty2 and phosphorylation changes are a prerequisite for ERK inhibition downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation. *J Biol Chem* 282, 9117-9126.
- Lee, S.H., Schloss, D.J., Jarvis, L., Krasnow, M.A., and Swain, J.L. (2001). Inhibition of angiogenesis by a mouse sprouty protein. *J Biol Chem* 276, 4128-4133.
- Leeksa, O.C., Van Achterberg, T.A., Tsumura, Y., Toshima, J., Eldering, E., Kroes, W.G., Mellink, C., Spaargaren, M., Mizuno, K., Pannekoek, H., *et al.* (2002). Human sprouty 4, a new ras antagonist on 5q31, interacts with the dual specificity kinase TESK1. *Eur J Biochem* 269, 2546-2556.
- Li, Z., and Wang, J. (2006). A forskolin derivative, FSK88, induces apoptosis in human gastric cancer BGC823 cells through caspase activation involving regulation of Bcl-2 family gene expression, dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. *Cell Biol Int* 30, 940-946.
- Liang, C., Zhang, M., and Sun, S.C. (2006). beta-TrCP binding and processing of NF-kappaB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. *Cell Signal* 18, 1309-1317.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., *et al.* (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389-1399.
- Liu, D., and Xing, M. (2008). Potent inhibition of thyroid cancer cells by the MEK inhibitor PD0325901 and its potentiation by suppression of the PI3K and NF-kappaB pathways. *Thyroid* 18, 853-864.
- Livolsi, V.A., and Feind, C.R. (1979). Incidental medullary thyroid carcinoma in sporadic hyperparathyroidism. An expansion of the concept of C-cell hyperplasia. *Am J Clin Pathol* 71, 595-599.
- Lloyd, R.V., Sisson, J.C., and Marangos, P.J. (1983). Calcitonin, carcinoembryonic antigen and neuron-specific enolase in medullary thyroid carcinoma. *Cancer* 51, 2234-2239.
- Lo, T.L., Yusoff, P., Fong, C.W., Guo, K., McCaw, B.J., Phillips, W.A., Yang, H., Wong, E.S., Leong, H.F., Zeng, Q., *et al.* (2004). The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer. *Cancer Res* 64, 6127-6136.
- Lodish, M.B., and Stratakis, C.A. (2008). RET oncogene in MEN2, MEN2B, MTC and other forms of thyroid cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 8, 625-632.
- Lorenzo, M.J., Gish, G.D., Houghton, C., Stonehouse, T.J., Pawson, T., Ponder, B.A., and Smith, D.P. (1997). RET alternate splicing influences the interaction of activated RET with the SH2 and PTB domains of Shc, and the SH2 domain of Grb2. *Oncogene* 14, 763-771.
- Ludwig, L., Kessler, H., Wagner, M., Hoang-Vu, C., Dralle, H., Adler, G., Bohm, B.O., and Schmid, R.M. (2001). Nuclear factor-kappaB is constitutively active in C-cell carcinoma and required for RET-induced transformation. *Cancer Res* 61, 4526-4535.
- Luo, J.L., Kamata, H., and Karin, M. (2005). The anti-death machinery in IKK/NF-kappaB signaling. *J Clin Immunol* 25, 541-550.
- Lupone, G., Antonino, A., Rosato, A., Zenone, P., Iervolino, E.M., Grillo, M., and De Palma, M. (2012). Surgical strategy for the treatment of sporadic medullary thyroid carcinoma: our experience. *G Chir* 33, 395-399.
- Macia, A., Gallel, P., Vaquero, M., Gou-Fabregas, M., Santacana, M., Maliszewska, A., Robledo, M., Gardiner, J.R., Basson, M.A., Matias-Guiu, X., *et al.* (2012). Sprouty1 is a

- candidate tumor-suppressor gene in medullary thyroid carcinoma. *Oncogene* 31, 3961-3972.
- Maeda, K., Murakami, H., Yoshida, R., Ichihara, M., Abe, A., Hirai, M., Murohara, T., and Takahashi, M. (2004). Biochemical and biological responses induced by coupling of Gab1 to phosphatidylinositol 3-kinase in RET-expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 345-354.
- Maliszewska, A., Leandro-Garcia, L.J., Castelblanco, E., Macia, A., de Cubas, A., Gomez-Lopez, G., Inglada-Perez, L., Alvarez-Escola, C., De la Vega, L., Leton, R., *et al.* (2013). Differential gene expression of medullary thyroid carcinoma reveals specific markers associated with genetic conditions. *Am J Pathol* 182, 350-362.
- Marsh, D.J., Learoyd, D.L., Andrew, S.D., Krishnan, L., Pojer, R., Richardson, A.L., Delbridge, L., Eng, C., and Robinson, B.G. (1996). Somatic mutations in the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 44, 249-257.
- Marsh, D.J., Theodosopoulos, G., Martin-Schulte, K., Richardson, A.L., Philips, J., Roher, H.D., Delbridge, L., and Robinson, B.G. (2003). Genome-wide copy number imbalances identified in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1866-1872.
- Marshall, G.M., Peaston, A.E., Hocker, J.E., Smith, S.A., Hansford, L.M., Tobias, V., Norris, M.D., Haber, M., Smith, D.P., Lorenzo, M.J., *et al.* (1997). Expression of multiple endocrine neoplasia 2B RET in neuroblastoma cells alters cell adhesion in vitro, enhances metastatic behavior in vivo, and activates Jun kinase. *Cancer Res* 57, 5399-5405.
- Martin-Zanca, D., Mitra, G., Long, L.K., and Barbacid, M. (1986). Molecular characterization of the human trk oncogene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 2, 983-992.
- Máson, J.M., Morrison, D.J., Basson, M.A., and Licht, J.D. (2006). Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol* 16, 45-54.
- Matias-Guiu, X., Machin, P., Pons, C., Lagarda, E., De Leiva, A., and Prat, J. (1998). Sustentacular cells occur frequently in the familial form of medullary thyroid carcinoma. *J Pathol* 184, 420-423.
- Matias-Guiu, X., Peiro, G., Esquius, J., Oliva, E., Cabezas, R., Colomer, A., and Prat, J. (1995). Proliferative activity in C-cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma. Evaluation by PCNA immunohistochemistry and AgNORs staining. *Pathol Res Pract* 191, 42-47.
- Matias-Guiu X, Bussolati G, DeLellis R KasererK, Moley JF, Williams ED, Gagel RF, Baloch Z, Albores-Saavedra J (2004). Medullary thyroid carcinoma. In: RA DeLellis et al Ed) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics. Tumours of Endocrine Organs: IARC Press. Lyon
- McDermott, M.B., Swanson, P.E., and Wick, M.R. (1995). Immunostains for collagen type IV discriminate between C-cell hyperplasia and microscopic medullary carcinoma in multiple endocrine neoplasia, type 2a. *Hum Pathol* 26, 1308-1312.
- McKie, A.B., Douglas, D.A., Olijslagers, S., Graham, J., Omar, M.M., Heer, R., Gnanapragasam, V.J., Robson, C.N., and Leung, H.Y. (2005). Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer. *Oncogene* 24, 2166-2174.
- Melillo, R.M., Carlomagno, F., De Vita, G., Formisano, P., Vecchio, G., Fusco, A., Billaud, M., and Santoro, M. (2001a). The insulin receptor substrate (IRS)-1 recruits phosphatidylinositol 3-kinase to Ret: evidence for a competition between Shc and IRS-1 for the binding to Ret. *Oncogene* 20, 209-218.
- Melillo, R.M., Santoro, M., Ong, S.H., Billaud, M., Fusco, A., Hadari, Y.R., Schlessinger, J., and Lax, I. (2001b). Docking protein FRS2 links the protein tyrosine kinase RET and its oncogenic forms with the mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *Mol Cell Biol* 21, 4177-4187.

- Mercalli, E., Ghizzoni, S., Arighi, E., Alberti, L., Sangregorio, R., Radice, M.T., Gishizky, M.L., Pierotti, M.A., and Borrello, M.G. (2001). Key role of Shc signaling in the transforming pathway triggered by Ret/ptc2 oncoprotein. *Oncogene* 20, 3475-3485.
- Michiels, F.M., Chappuis, S., Caillou, B., Pasini, A., Talbot, M., Monier, R., Lenoir, G.M., Feunteun, J., and Billaud, M. (1997). Development of medullary thyroid carcinoma in transgenic mice expressing the RET protooncogene altered by a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3330-3335.
- Michos, O., Cebrian, C., Hyink, D., Grieshammer, U., Williams, L., D'Agati, V., Licht, J.D., Martin G.R. and Costantini, F. (2010). Kidney development in the absence of Gdnf and Spry1 requires Fgf10. *PLoS Genet* 6(1), e1000809.
- Mukhopadhyay, T., Roth, J.A., and Maxwell, S.A. (1995). Altered expression of the p50 subunit of the NF-kappa B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 11, 999-1003.
- Muller, U. (2011). Pathological mechanisms and parent-of-origin effects in hereditary paraganglioma/pheochromocytoma (PGL/PCC). *Neurogenetics* 12, 175-181.
- Mulligan, L.M., Kwok, J.B., Healey, C.S., Elsdon, M.J., Eng, C., Gardner, E., Love, D.R., Mole, S.E., Moore, J.K., Papi, L., *et al.* (1993). Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363, 458-460.
- Mulligan, L.M., Marsh, D.J., Robinson, B.G., Schuffenecker, I., Zedenius, J., Lips, C.J., Gagel, R.F., Takai, S.I., Noll, W.W., Fink, M., *et al.* (1995). Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the International RET Mutation Consortium. *J Intern Med* 238, 343-346.
- Murakami, H., Iwashita, T., Asai, N., Iwata, Y., Narumiya, S., and Takahashi, M. (1999). Rho-dependent and -independent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin and p130Cas mediated by Ret kinase. *Oncogene* 18, 1975-1982.
- Murakami, H., Yamamura, Y., Shimono, Y., Kawai, K., Kurokawa, K., and Takahashi, M. (2002). Role of Dok1 in cell signaling mediated by RET tyrosine kinase. *J Biol Chem* 277, 32781-32790.
- Myers, S.M., Eng, C., Ponder, B.A., and Mulligan, L.M. (1995). Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. *Oncogene* 11, 2039-2045.
- Nair, A., Venkatraman, M., Maliekal, T.T., Nair, B., and Karunakaran, D. (2003). NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene* 22, 50-58.
- Nakagawa, T., Mabry, M., de Bustros, A., Ihle, J.N., Nelkin, B.D., and Baylin, S.B. (1987). Introduction of v-Ha-ras oncogene induces differentiation of cultured human medullary thyroid carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5923-5927.
- Neri, A., Chang, C.C., Lombardi, L., Salina, M., Corradini, P., Maiolo, A.T., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1991). B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF-kappa B p50. *Cell* 67, 1075-1087.
- Neri, A., Fracchiolla, N.S., Roscetti, E., Garatti, S., Trecca, D., Boletini, A., Perletti, L., Baldini, L., Maiolo, A.T., and Berti, E. (1995). Molecular analysis of cutaneous B- and T-cell lymphomas. *Blood* 86, 3160-3172.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Ohiwa, M., Murakami, H., Iwashita, T., Asai, N., Iwata, Y., Imai, T., Funahashi, H., Takagi, H., and Takahashi, M. (1997). Characterization of Ret-Shc-Grb2 complex induced by GDNF, MEN 2A, and MEN 2B mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 747-751.
- Ouaaz, F., Li, M., and Beg, A.A. (1999). A critical role for the RelA subunit of nuclear factor kappaB in regulation of multiple immune-response genes and in Fas-induced cell death. *J Exp Med* 189, 999-1004.

- Pacifico, F., Mauro, C., Barone, C., Crescenzi, E., Mellone, S., Monaco, M., Chiappetta, G., Terrazzano, G., Liguoro, D., Vito, P., *et al.* (2004). Oncogenic and anti-apoptotic activity of NF-kappa B in human thyroid carcinomas. *J Biol Chem* 279, 54610-54619.
- Pacini, F., Castagna, M.G., Cipri, C., and Schlumberger, M. (2010). Medullary thyroid carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 22, 475-485.
- Pallares, J., Martinez-Guitarte, J.L., Dolcet, X., Llobet, D., Rue, M., Palacios, J., Prat, J., and Matias-Guiu, X. (2004). Abnormalities in the NF-kappaB family and related proteins in endometrial carcinoma. *J Pathol* 204, 569-577.
- Pandey, A., Duan, H., Di Fiore, P.P., and Dixit, V.M. (1995). The Ret receptor protein tyrosine kinase associates with the SH2-containing adapter protein Grb10. *J Biol Chem* 270, 21461-21463.
- Pandey, A., Liu, X., Dixon, J.E., Di Fiore, P.P., and Dixit, V.M. (1996). Direct association between the Ret receptor tyrosine kinase and the Src homology 2-containing adapter protein Grb7. *J Biol Chem* 271, 10607-10610.
- Pandit, S.D., Donis-Keller, H., Iwamoto, T., Tomich, J.M., and Pike, L.J. (1996). The multiple endocrine neoplasia type 2B point mutation alters long-term regulation and enhances the transforming capacity of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 271, 5850-5858.
- Papotti, M., Arrondini, M., Tavaglione, V., Veltri, A., and Volante, M. (2008). Diagnostic controversies in vascular proliferations of the thyroid gland. *Endocr Pathol* 19, 175-183.
- Papotti, M., Sambataro, D., Pecchioni, C., and Bussolati, G. (1996). The Pathology of Medullary Carcinoma of the Thyroid: Review of the Literature and Personal Experience on 62 Cases. *Endocr Pathol* 7, 1-20.
- Pasini, B., Ceccherini, I., and Romeo, G. (1996). RET mutations in human disease. *Trends Genet* 12, 138-144.
- Pasini, B., McWhinney, S.R., Bei, T., Matyakhina, L., Stergiopoulos, S., Muchow, M., Boikos, S.A., Ferrando, B., Pacak, K., Assie, G., *et al.* (2008). Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD. *Eur J Hum Genet* 16, 79-88.
- Pasquali, D., Di Matteo, F.M., Renzullo, A., Accardo, G., Esposito, D., Barbato, F., Colantuoni, V., Circelli, L., and Conzo, G. (2012). Multiple endocrine neoplasia, the old and the new: a mini review. *G Chir* 33, 370-373.
- Pellicci, G., Troglio, F., Bodini, A., Melillo, R.M., Pettirossi, V., Coda, L., De Giuseppe, A., Santoro, M., and Pelicci, P.G. (2002). The neuron-specific Rai (ShcC) adaptor protein inhibits apoptosis by coupling Ret to the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22, 7351-7363.
- Perry, A., Molberg, K., and Albores-Saavedra, J. (1996). Physiologic versus neoplastic C-cell hyperplasia of the thyroid: separation of distinct histologic and biologic entities. *Cancer* 77, 750-756.
- Phitayakorn, R., Faquin, W., Wei, N., Barbesino, G., and Stephen, A.E. (2011). Thyroid-associated paragangliomas. *Thyroid* 21, 725-733.
- Pierchala, B.A., Milbrandt, J., and Johnson, E.M., Jr. (2006). Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent recruitment of Ret into lipid rafts enhances signaling by partitioning Ret from proteasome-dependent degradation. *J Neurosci* 26, 2777-2787.
- Pierchala, B.A., Tsui, C.C., Milbrandt, J. and Johnson E.M. (2007). NGF augments the autophosphorylation of Ret via inhibition of ubiquitin-dependent degradation. *J Neurochem* 100, 1169-1176.
- Pierotti, M.A., Bongarzone, I., Borrello, M.G., Mariani, C., Miranda, C., Sozzi, G., and Greco, A. (1995). Rearrangements of TRK proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas. *J Endocrinol Invest* 18, 130-133.
- Pilaete, K., Delaere, P., Decallonne, B., Bex, M., Hauben, E., Nuyts, S., Clement, P., Hermans, R., and Vander Poorten, V. (2012). Medullary thyroid cancer: prognostic factors for survival and recurrence, recommendations for the extent of lymph node dissection and for surgical therapy in recurrent disease. *B-ent* 8, 113-121.

- Putcha, G.V., Moulder, K.L., Golden, J.P., Bouillet, P., Adams, J.A., Strasser, A., and Johnson, E.M. (2001). Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* 29, 615-628.
- Qiao, S., Iwashita, T., Furukawa, T., Yamamoto, M., Sobue, G., and Takahashi, M. (2001). Differential effects of leukocyte common antigen-related protein on biochemical and biological activities of RET-MEN2A and RET-MEN2B mutant proteins. *J Biol Chem* 276, 9460-9467.
- Qin, Z.H., Chen, R.W., Wang, Y., Nakai, M., Chuang, D.M., and Chase, T.N. (1999). Nuclear factor kappaB nuclear translocation upregulates c-Myc and p53 expression during NMDA receptor-mediated apoptosis in rat striatum. *J Neurosci* 19, 4023-4033.
- Ramos-Levi, A.M., Diaz-Perez, A., Sobrido, M.J., Pineiro-Hermida, S., Blanco-Arias, P., Cabezas-Agricola, J.M., Pascual-Pascual, S.I., and Araujo-Vilar, D. (2012). Axonal neuropathy, long limbs and bumpy tongue: think of MEN2B. *Muscle Nerve* 46, 961-964.
- Rayet, B., and Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18, 6938-6947.
- Reich, A., Sapir, A., and Shilo, B. (1999). Sprouty is a general inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling. *Development* 126, 4139-4147.
- Rieu, M., Lame, M.C., Richard, A., Lissak, B., Sambort, B., Vuong-Ngoc, P., Berrod, J.L., and Fombeur, J.P. (1995). Prevalence of sporadic medullary thyroid carcinoma: the importance of routine measurement of serum calcitonin in the diagnostic evaluation of thyroid nodules. *Clin Endocrinol (Oxf)* 42, 453-460.
- Rodriguez-Antona, C., Pallares, J., Montero-Conde, C., Inglada-Perez, L., Castelblanco, E., Landa, I., Leskela, S., Leandro-Garcia, L.J., Lopez-Jimenez, E., Leton, R., *et al.* (2010). Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis. *Endocr Relat Cancer* 17, 7-16.
- Rodriguez-Rodero, S., Fernandez, A.F., Fernandez-Morera, J.L., Castro-Santos, P., Bayon, G.F., Ferrero, C., Urdinguio, R.G., Gonzalez-Marquez, R., Suarez, C., Fernandez-Vega, I., *et al.* (2013). DNA methylation signatures identify biologically distinct thyroid cancer subtypes. *J Clin Endocrinol Metab* 98, 2811-2821.
- Rohmer, V., Vidal-Trecan, G., Bourdelot, A., Niccoli, P., Murat, A., Wemeau, J.L., Borson-Chazot, F., Schvartz, C., Tabarin, A., Chabre, O., *et al.* (2011). Prognostic factors of disease-free survival after thyroidectomy in 170 young patients with a RET germline mutation: a multicenter study of the Groupe Francais d'Etude des Tumeurs Endocrines. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E509-518.
- Romieu-Mourez, R., Kim, D.W., Shin, S.M., Demicco, E.G., Landesman-Bollag, E., Seldin, D.C., Cardiff, R.D., and Sonenshein, G.E. (2003). Mouse mammary tumor virus c-rel transgenic mice develop mammary tumors. *Mol Cell Biol* 23, 5738-5754.
- Runeberg-Roos, P., Virtanen, H., and Saarma, M. (2007). RET(MEN 2B) is active in the endoplasmic reticulum before reaching the cell surface. *Oncogene* 26, 7909-7915.
- Saarma, M. (2000). GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily? *Eur J Biochem* 267, 6968-6971.
- Saarma, M., and Sariola, H. (1999). Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech* 45, 292-302.
- Salvatore, D., Melillo, R.M., Monaco, C., Visconti, R., Fenzi, G., Vecchio, G., Fusco, A., and Santoro, M. (2001). Increased in vivo phosphorylation of ret tyrosine 1062 is a potential pathogenetic mechanism of multiple endocrine neoplasia type 2B. *Cancer Res* 61, 1426-1431.
- Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91, 443-446.
- Sambade, C., Baldaque-Faria, A., Cardoso-Oliveira, M., and Sobrinho-Simoes, M. (1988). Follicular and papillary variants of medullary carcinoma of the thyroid. *Pathol Res Pract* 184, 98-107.
- Santoro, M., Carlomagno, F., Romano, A., Bottaro, D.P., Dathan, N.A., Grieco, M., Fusco, A., Vecchio, G., Matoskova, B., Kraus, M.H., *et al.* (1995). Activation of RET as a dominant

- transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science* 267, 381-383.
- Santoro, M., Wong, W.T., Aroca, P., Santos, E., Matoskova, B., Grieco, M., Fusco, A., and di Fiore, P.P. (1994). An epidermal growth factor receptor/ret chimera generates mitogenic and transforming signals: evidence for a ret-specific signaling pathway. *Mol Cell Biol* 14, 663-675.
- Sariola, H., and Saarma, M. (2003). Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 116, 3855-3862.
- Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M., and Yoshimura, A. (2003). Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Cell Cycle* 2, 281-282.
- Sasaki, N., Morisaki, T., Hashizume, K., Yao, T., Tsuneyoshi, M., Noshiro, H., Nakamura, K., Yamanaka, T., Uchiyama, A., Tanaka, M., *et al.* (2001). Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin Cancer Res* 7, 4136-4142.
- Schagdarsurengin, U., Gimm, O., Hoang-Vu, C., Dralle, H., Pfeifer, G.P., and Dammann, R. (2002). Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 62, 3698-3701.
- Schmit, G.D., Gorman, B., van Heerden, J.A., and Gharib, H. (2006). Inferior laryngeal paraganglioma mimicking a primary thyroid tumor. *Endocr Pract* 12, 432-435.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., and Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367, 380-383.
- Scott, R.P., Eketjall, S., Aineskog, H., and Ibanez, C.F. (2005). Distinct turnover of alternatively spliced isoforms of the RET kinase receptor mediated by differential recruitment of the Cbl ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 280, 13442-13449.
- Segouffin-Cariou, C., and Billaud, M. (2000). Transforming ability of MEN2A-RET requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway. *J Biol Chem* 275, 3568-3576.
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., *et al.* (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495-1499.
- Shou, Y., Li, N., Li, L., Borowitz, J.L., and Isom, G.E. (2002). NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-X(S) and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis. *J Neurochem* 81, 842-852.
- Singh, K., Sharma, M.C., Jain, D., and Kumar, R. (2008). Melanotic medullary carcinoma of thyroid--report of a rare case with brief review of literature. *Diagn Pathol* 3, 2.
- Smallridge, R.C., Bourne, K., Pearson, B.W., Van Heerden, J.A., Carpenter, P.C., and Young, W.F. (2003). Cushing's syndrome due to medullary thyroid carcinoma: diagnosis by proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid in situ hybridization. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4565-4568.
- Smith-Hicks, C.L., Sizer, K.C., Powers, J.F., Tischler, A.S., and Costantini, F. (2000). C-cell hyperplasia, pheochromocytoma and sympathoadrenal malformation in a mouse model of multiple endocrine neoplasia type 2B. *Embo j* 19, 612-622.
- Sobrinho-Simoes, M., Sambade, C., Nesland, J.M., Holm, R., and Damjanov, I. (1990). Lectin histochemistry and ultrastructure of medullary carcinoma of the thyroid gland. *Arch Pathol Lab Med* 114, 369-375.
- Songyang, Z., Carraway, K.L., 3rd, Eck, M.J., Harrison, S.C., Feldman, R.A., Mohammadi, M., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., Smith, D.P., Eng, C., *et al.* (1995). Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* 373, 536-539.
- Sovak, M.A., Bellas, R.E., Kim, D.W., Zanieski, G.J., Rogers, A.E., Traish, A.M., and Sonenshein, G.E. (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 100, 2952-2960.

- Sugawara, M., Geffner, D.L., Martinez, D., and Hershman, J.M. (2009). Novel treatment of medullary thyroid cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16, 367-372.
- SunTERS, A., Fernandez de Mattos, S., Stahl, M., Brosens, J.J., Zoumpoulidou, G., Saunders, C.A., Coffey, P.J., Medema, R.H., Coombes, R.C., and Lam, E.W. (2003). FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 278, 49795-49805.
- Sutterluty, H., Mayer, C.E., Setinek, U., Attems, J., Ovtcharov, S., Mikula, M., Mikulits, W., Micksche, M., and Berger, W. (2007). Down-regulation of Sprouty2 in non-small cell lung cancer contributes to tumor malignancy via extracellular signal-regulated kinase pathway-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cancer Res* 5, 509-520.
- Taccaliti A, Silvetti F., Palmonella G. and Boscaro M. (2011). Genetic alterations in medullary thyroid cancer: diagnostic and prognostic markers. *Curr Genomics* 12, 618-625.
- Tahira, T., Shiraishi, M., Ishizaka, Y., Ikeda, I., Sakai, R., Sugimura, T., and Nagao, M. (1990). A TaqI RFLP in the human ret proto-oncogene. *Nucleic Acids Res* 18, 7472.
- Takahashi, M., Asai, N., Iwashita, T., Isomura, T., Miyazaki, K., and Matsuyama, M. (1993). Characterization of the ret proto-oncogene products expressed in mouse L cells. *Oncogene* 8, 2925-2929.
- Takahashi, M., Buma, Y., and Hiai, H. (1989). Isolation of ret proto-oncogene cDNA with an amino-terminal signal sequence. *Oncogene* 4, 805-806.
- Takahashi, M., Buma, Y., Iwamoto, T., Inaguma, Y., Ikeda, H., and Hiai, H. (1988). Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 3, 571-578.
- Takahashi, M., and Cooper, G.M. (1987). ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 7, 1378-1385.
- Takahashi, M., Ritz, J., and Cooper, G.M. (1985). Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 42, 581-588.
- Taketomi, T., Yoshiga, D., Taniguchi, K., Kobayashi, T., Nonami, A., Kato, R., Sasaki, M., Sasaki, A., Ishibashi, H., Moriyama, M., *et al.* (2005). Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia. *Nat Neurosci* 8, 855-857.
- Tamatani, M., Che, Y.H., Matsuzaki, H., Ogawa, S., Okado, H., Miyake, S., Mizuno, T., and Tohyama, M. (1999). Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem* 274, 8531-8538.
- Tamburrino, A., Molinolo, A.A., Salerno, P., Chernock, R.D., Raffeld, M., Xi, L., Gutkind, J.S., Moley, J.F., Wells, S.A., Jr., and Santoro, M. (2012). Activation of the mTOR pathway in primary medullary thyroid carcinoma and lymph node metastases. *Clin Cancer Res* 18, 3532-3540.
- Tansey, M.G., Baloh, R.H., Milbrandt, J., and Johnson, E.M., Jr. (2000). GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* 25, 611-623.
- Tischer A.S. et al (2004). Extra-adrenal sympathetic paraganglioma: Cervical, intrathoracic and urinary bladder in Tumours of Endocrine Organs WHO Clasiffication of Tumours. Book. Lyon(France): IARCPress.
- Trupp, M., Belluardo, N., Funakoshi, H., and Ibanez, C.F. (1997). Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Neurosci* 17, 3554-3567.
- Tsavachidou, D., Coleman, M.L., Athanasiadis, G., Li, S., Licht, J.D., Olson, M.F., and Weber, B.L. (2004). SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant. *Cancer Res* 64, 5556-5559.
- Uribe, M., Fenoglio-Preiser, C.M., Grimes, M., and Feind, C. (1985). Medullary carcinoma of the thyroid gland. Clinical, pathological, and immunohistochemical features with review of the literature. *Am J Surg Pathol* 9, 577-594.

- Vainio, S., and Lin, Y. (2002). Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nat Rev Genet* 3, 533-543.
- van Nederveen, F.H., Gaal, J., Favier, J., Korpershoek, E., Oldenburg, R.A., de Bruyn, E.M., Sleddens, H.F., Derkx, P., Riviere, J., Dannenberg, H., *et al.* (2009). An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and pheochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis. *Lancet Oncol* 10, 764-771.
- van Weering, D.H., and Bos, J.L. (1997). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces Ret-mediated lamellipodia formation. *J Biol Chem* 272, 249-254.
- van Weering, D.H., Medema, J.P., van Puijenbroek, A., Burgering, B.M., Baas, P.D., and Bos, J.L. (1995). Ret receptor tyrosine kinase activates extracellular signal-regulated kinase 2 in SK-N-MC cells. *Oncogene* 11, 2207-2214.
- Velasco, A., Pallares, J., Santacana, M., Gatus, S., Fernandez, M., Domingo, M., Valls, J., Yeramian, A., Encinas, M., Dolcet, X., *et al.* (2011). Promoter hypermethylation and expression of sprouty 2 in endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 42, 185-193.
- Walensky, L.D. (2006). BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ* 13, 1339-1350.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.
- Wells, S.A., Jr., Chi, D.D., Toshima, K., Dehner, L.P., Coffin, C.M., Dowton, S.B., Ivanovich, J.L., DeBenedetti, M.K., Dilley, W.G., Moley, J.F., *et al.* (1994). Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. *Ann Surg* 220, 237-247; discussion 247-250.
- Wells, S.A., Jr., Robinson, B.G., Gagel, R.F., Dralle, H., Fagin, J.A., Santoro, M., Baudin, E., Elisei, R., Jarzab, B., Vasselli, J.R., *et al.* (2012). Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J Clin Oncol* 30, 134-141.
- Wells, S.A., Jr., and Santoro, M. (2009). Targeting the RET pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 15, 7119-7123.
- Weston, C.R., Balmano, K., Chalmers, C., Hadfield, K., Molton, S.A., Ley, R., Wagner, E.F., and Cook, S.J. (2003). Activation of ERK1/2 by deltaRaf-1:ER* represses Bim expression independently of the JNK or PI3K pathways. *Oncogene* 22, 1281-1293.
- Williams, E.D. (1966). Histogenesis of medullary carcinoma of the thyroid. *J Clin Pathol* 19(2):114-118.
- Wolf, B.B., and Green, D.R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274, 20049-20052.
- Wolfe, H.J., Melvin, K.E., Cervi-Skinner, S.J., Saadi, A.A., Juliar, J.F., Jackson, C.E., and Tashjian, A.H., Jr. (1973). C-cell hyperplasia preceding medullary thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 289, 437-441.
- Worby, C.A., Vega, Q.C., Zhao, Y., Chao, H.H., Seasholtz, A.F., and Dixon, J.E. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271, 23619-23622.
- Xiao, G., Fong, A., and Sun, S.C. (2004). Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 30099-30105.
- Yano, Y., Nagahama, M., Sugino, K., Ito, K., and Kameyama, K. (2007). Paraganglioma of the thyroid: report of a male case with ultrasonographic imaging, cytologic, histologic, and immunohistochemical features. *Thyroid* 17, 575-578.
- Ye, L., Santarpia, L., Cote, G.J., El-Naggar, A.K., and Gagel, R.F. (2008). High resolution array-comparative genomic hybridization profiling reveals deoxyribonucleic acid copy number alterations associated with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 4367-4372.

- Yen, T.W., Shapiro, S.E., Gagel, R.F., Sherman, S.I., Lee, J.E., and Evans, D.B. (2003). Medullary thyroid carcinoma: results of a standardized surgical approach in a contemporary series of 80 consecutive patients. *Surgery* 134, 890-899; discussion 899-901.
- Yin, L., Puliti, A., Bonora, E., Evangelisti, C., Conti, V., Tong, W.M., Medard, J.J., Lavoue, M.F., Forey, N., Wang, L.C., *et al.* (2007). C620R mutation of the murine ret proto-oncogene: loss of function effect in homozygotes and possible gain of function effect in heterozygotes. *Int J Cancer* 121, 292-300.
- Yip, L., Cote, G.J., Shapiro, S.E., Ayers, G.D., Herzog, C.E., Sellin, R.V., Sherman, S.I., Gagel, R.F., Lee, J.E., and Evans, D.B. (2003). Multiple endocrine neoplasia type 2: evaluation of the genotype-phenotype relationship. *Arch Surg* 138, 409-416; discussion 416.
- Yu, T., Scully, S., Yu, Y., Fox, G.M., Jing, S., and Zhou, R. (1998). Expression of GDNF family receptor components during development: implications in the mechanisms of interaction. *J Neurosci* 18, 4684-4696.
- Yusoff, P., Lao, D.H., Ong, S.H., Wong, E.S., Lim, J., Lo, T.L., Leong, H.F., Fong, C.W., and Guy, G.R. (2002). Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. *J Biol Chem* 277, 3195-3201.
- Zaatari, G.S., Saigo, P.E., and Huvos, A.G. (1983). Mucin production in medullary carcinoma of the thyroid. *Arch Pathol Lab Med* 107, 70-74.
- Zakkar, M., and Hunt, I. (2013). Primary cervicothoracic thyroid paraganglioma. *Eur J Cardiothorac Surg* 43, 652.
- Zbuk, K.M., and Eng, C. (2007). Cancer phenomics: RET and PTEN as illustrative models. *Nat Rev Cancer* 7, 35-45.
- Zeng, Q., Kwan, A., and Oakley, B. (2000). Gustatory innervation and bax-dependent caspase-2: participants in the life and death pathways of mouse taste receptor cells. *J Comp Neurol* 424, 640-650.

8. ANEXO

De esta tesis han derivado los siguientes articulos.

